

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

**EFFECTOS ANTIISQUEMICOS DEL BLOQUEANTE DE
LA Ca^{2+} -ATPasa DEL RETICULO SARCOPLASMICO,
ACIDO CICLOPIAZONICO, SOBRE LA ISQUEMIA
EXPERIMENTAL DEL CORAZON DE CONEJO**

Direct:.

TESIS DOCTORAL

**Martín del Avellanal Calzadilla
Madrid 1996**

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

SANTOS BARRIGON VAZQUEZ, PROFESOR TITULAR DEL DPTO. DE FARMACOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

INFORMA:

Que el trabajo de investigación realizado bajo mi dirección por D. MARTIN DEL AVELLANAL CALZADILLA reúne los requisitos y condiciones necesarias para ser defendido como Tesis Doctoral.


Madrid, 14 de Noviembre de 1996

Vº Bº
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis

Fdo.: _____
(Fecha y firma)

DNI


Fdo.: S. BARRIGON VAZQUEZ
(Fecha y firma)

DNI 12.202.353

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

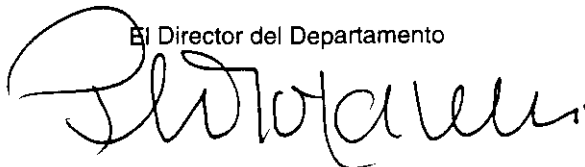
El Consejo del Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, INFORMA FAVORABLEMENTE la presentación y defensa del trabajo presentado por D. MARTIN DEL AVELLANAL CALZADILLA dirigido por el Prof. Santos Barrigón Vázquez, Profesor Titular de este Departamento.

Madrid, 15 de Noviembre 1996

Fecha reunión
Consejo Departamento

14-11-1996

El Director del Departamento



Fdo.: Prof. P. LORENZO
(Fecha y firma)

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Dpto de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Dr. Santos Barrigón Vázquez, a quien expreso mi más sincera gratitud por su amistad, dedicación y apoyo llevados al extremo. Igualmente quiero agradecer la infinita paciencia de su familia (Pilar, María, Laura y Enrique), a quien he robado no pocos momentos de intimidad y descanso.

Expreso mi gratitud a todo el Departamento de Farmacología la colaboración y ayuda que me han prestado en este tiempo.

El estudio de microscopía ha sido realizado en el Dpto de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, bajo la dirección del Dr. Emilio Alvarez Fernández, Jefe del Departamento y Profesor Titular de esta Universidad. Quiero dejar constancia de mi agradecimiento por su disponibilidad y por las facilidades que ha prestado para llevar a cabo el estudio ultraestructural.

Los análisis de soluciones y la determinación de enzimas de necrosis en el efluente se realizaron en el Servicio de Bioquímica del mismo Hospital, expresando en conjunto mi gratitud a todos cuantos colaboraron.

Por último, agradecer el ánimo prestado en el Servicio de Anestesiología y Reanimación del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

**EFFECTOS ANTISQUEMICOS DEL BLOQUEANTE DE LA
Ca²⁺-ATPasa DEL RETICULO SARCOPLASMICO,
ACIDO CICLOPIAZONICO, SOBRE LA ISQUEMIA
EXPERIMENTAL DEL CORAZON DE CONEJO**

**Martín del Avellanal Calzadilla
Madrid 1996**

- INDICE.

	Página
I.- INTRODUCCION.....	1
I.1.- BASES ESTRUCTURALES DE LA CONTRACTILIDAD MIOCARDICA.....	6
I.1.1.- MIOSINA.....	9
I.1.2.- ACTINA.....	10
I.1.3.- TROPOMIOSINA.....	11
I.1.4.- TROPONINA.....	11
I.1.5.- TEORIA DEL DESLIZAMIENTO.....	13
I.2.- ACOPLAMIENTO EXCITACION-CONTRACCION..	15
I.2.1.- MECANISMOS DE ENTRADA DE Ca^{2+} A TRAVES DEL SARCOLEMA.....	19
I.2.2.- MECANISMOS DE SALIDA DE Ca^{2+} ATRAVES DEL SARCOLEMA.....	21
I.2.2.1.- BOMBA DE Ca^{2+} -ATP-DEPENDIENTE	22
I.2.2.2.- INTERCAMBIADOR $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$	23
I.2.3.- FUNCION DEL RETICULO SARCOPLASMICO	24
I.2.3.1.- SALIDA DE Ca^{2+} RETICULO SARCOPLASMICO. CANALES DE Ca^{2+}	25
I.2.3.2.- ENTRADA DE Ca^{2+} AL RETICULO SARCOPLASMICO. BOMBA DE Ca^{2+} ATP-DEPENDIENTE.....	29
I.2.3.3.- ALMACENAMIENTO DE CALCIO EN EL RETICULO SARCOPLASMICO. PROTEINAS LIGADORAS DE CALCIO	31
I.2.3.4.- IMPORTANCIA RELATIVA DEL RS SEGUN ESPECIES.....	31
I.2.4.- FUNCION DE LA MITOCONDRIA.....	34
I.2.5.- FUNCION DEL SARCOLEMA.....	34

I.3.- ISQUEMIA MIOCARDICA.....37

I.3.1.- FISIOPATOLOGIA DE LA ISQUEMIA..... 37

I.3.1.1.- DIFERENCIAS HIPOXIA ISQUEMIA.... 39

I.3.1.2.- ALTERACIONES METABOLICAS E IONICAS..... 40

I.3.1.3.- ALTERACIONES ELECTROFISIOLOG. 49

I.3.1.4.- ALTERACIONES DE LA EXPRESION GENICA.....50

I.3.1.5.- ALTERACIONES FUNCIONALES..... 51

I.3.1.6.- ALTERACIONES ESTRUCTURALES.... 53

I.3.2.- MIOCARDIO "HIBERNADO" Y "CONTUNDIDO" 55

I.3.3.- PRECONDICIONAMIENTO ISQUEMICO..... 59

I.3.4.- FISIOPATOLOGIA DE LA REPERFUSION MIOCARDICA..... 61

I.3.4.1.- FENOMENOS RESPONSABLES DEL DAÑO INDUCIDO POR REPERFUSION..... 61

I.3.4.2.- REPERFUSION DE MIOCITOS CON DAÑO REVERSIBLE..... 65

I.3.4.3.- REPERFUSION DE MIOCITOS CON DAÑO IRREVERSIBLE..... 66

I.3.4.4.- PAPEL DEL CALCIO EN EL DAÑO INDUCIDO POR REPERFUSION..... 68

I.4.- INHIBIDORES DE LA Ca^{2+} -ATPasa DEL RS.....72

I.4.1.- ACIDO CICLOPIAZONICO.....72

I.4.2.- THAPSIGARGINA.....74

II.- PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS..... 76

III.- MATERIAL Y METODOS..... 81

III.1.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL. SISTEMA DE

DIGITALIZACION.....	82
III.1.1.- MEDIDA AUTOMATIZADA DE LAS CONTRACCIONES.....	86
III.2.- EFECTOS DEL CPA SOBRE PARAMETROS CONTRACTILES.....	98
III.2.1.- CURVAS DOSIS-EFECTO Y EXPERIMENTOS CONTROL.....	98
III.3.- ESTUDIOS SOBRE PARAMETROS DE CONTRACTILIDAD EN ISQUEMIA.....	99
III.3.1.- ISQUEMIA GLOBAL. TECNICA GENERAL. EXPERIMENTOS CONTROL.....	99
III.3.2.- EXPERIEMNTOS CON CPA EN ISQUEMIA..	100
III.4.- ESTUDIOS SOBRE PARAMETROS BIOQUIMICOS....	101
III.5.- ESTUDIOS SOBRE PARAMETROS MORFOLOGICOS.	102
III.6.- ANALISIS ESTADISTICO.....	104
III.7.- FARMACOS Y OTROS PRODUCTOS.....	104
IV.- RESULTADOS.....	105
IV.1.- ANALISIS INTERGRUPO DE LA HOMOGENEIDAD DE LOS GRUPOS DE ANIMALES Y CONDICIONES DE EXPERIMENTACION.....	106
IV.2.- EFECTOS DEL CPA SOBRE CONTRACTILIDAD MIOCARDICA.....	108
IV.2.1.- CURVAS DOSIS-EFECTO ACUMULATIVAS.....	108
IV.2.2.- EFECTOS UNITARIOS DEL CPA 10^{-6} Y 10^{-5} M....	111
IV.3.- EFECTOS DE ISQUEMIA-REPERFUSION SOBRE PARAMETROS CONTRACTILES.....	122
IV.3.1.- EFECTOS DE LA ISQUEMIA DE 30 MINUTOS SEGUIDA DE 30 MiN DE REPERFUSION.....	122
IV.3.2.- CARACTERISTICAS CINETICAS DE LA MODIFICACION DE LOS PARAMETROS	

CONTRACTILES POR LA ISQUEMIA.....	132
IV.4.- EFECTOS DE LA ISQUEMIA-REPERFUSION SOBRE PARAMETROS BIOQUIMICOS.....	143
IV.5.- EFECTOS DE LA ISQUEMIA-REPERFUSION SOBRE PARAMETROS MORFOLOGICOS.....	148
V.- DISCUSION.....	156
VI.-CONCLUSIONES.....	191
VII.- ANEXOS.....	195
VIII.- BIBLIOGRAFIA.....	229

I.- INTRODUCCION

En las últimas cuatro décadas la cardiopatía isquémica ha sido la causa de mortalidad más importante en los países industrializados, ocasionando entre el 12 y el 45 % de todas las defunciones (Thom, 1989). El número de infartos agudos de miocardio que ocurren anualmente en España en sujetos entre 25 y 74 años podría estimarse alrededor de los 27.000 (Pérez *et al*, 1993).

El corazón es un órgano que se halla en constante funcionamiento desarrollando un trabajo considerable y tiene, por tanto, un gran consumo de energía. Ejemplo de este importante consumo es el ventrículo izquierdo, que si bien constituye tan solo un 0,3% del peso corporal total en el ser humano, utiliza el 7% del consumo de oxígeno del cuerpo en reposo (Katz, 1992).

Existen importantes diferencias entre el metabolismo del músculo esquelético y el del cardíaco. Este se encuentra en constante actividad y presenta más mitocondrias (un 36% del volumen celular total en miocitos ventriculares de rata lo constituyen las mitocondrias (Page, 1978)), puede utilizar más sustratos que el músculo esquelético (que depende casi exclusivamente de la glucosa) y, en condiciones normales, la producción de energía en el músculo cardíaco tiene lugar por medios totalmente aeróbicos. De hecho, el músculo cardíaco no desarrolla una deuda de oxígeno apreciable durante cada contracción, a diferencia del músculo esquelético que debe pagar esa deuda durante los períodos de reposo.

Este consumo de energía rápido y mantenido a través de las vías de fosforilación oxidativa tiene un precio: la dependencia absoluta del corazón de un suministro de sustratos (principalmente oxígeno), que no pueden almacenarse en el miocardio.

Si bien la isquemia miocárdica es consecuencia de la oclusión de las arterias coronarias, los mecanismos fisiopatológicos que se desencadenan desde el momento que cesa el aporte de sustratos al tejido miocárdico, son múltiples y presentan interrelaciones y cronologías características. Todos ellos, actuando conjuntamente, acaban produciendo alteraciones funcionales inicialmente, y la muerte celular, por último, si no se restablece el flujo coronario en pocos minutos.

La reperusión del miocárdio isquémico lleva asociada, además, una serie de fenómenos (sobrecarga de calcio y paradoja del O₂ fundamentalmente) que pueden contribuir a aumentar el daño celular (Braunwald y Kloner, 1985).

Los grandes puntos de intervención a la hora de tratar de disminuir la repercusión de la cardiopatía isquémica son: (a) la prevención y el tratamiento precoz de la enfermedad coronaria, y (b) la actuación sobre los múltiples mecanismos que dan lugar al daño celular durante la isquemia miocárdica y la reperusión (aplicable además a la mejor conservación del corazón durante la cirugía realizada con parada cardíaca). En este último apartado, el papel del calcio y de los diversos

mecanismos que regulan su homeostasis a nivel celular durante la isquemia-reperfusión, constituyen uno de los puntos de investigación más pujantes (Barry y Bridge, 1993).

Hasta la fecha, múltiples intervenciones farmacológicas que afectan a la dinámica del calcio a nivel celular en el contexto de la isquemia y perfusión miocárdicas, han sido ya estudiadas. A pesar de existir evidencias indirectas que involucran al calcio almacenado en el retículo sarcoplásmico con el daño celular durante la isquemia y, más particularmente, durante la perfusión (Miller y Tormey, 1995), no hay estudios que analicen en profundidad los posibles efectos antiisquémicos del bloqueo farmacológico de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico. Ello se debe, fundamentalmente, a que hasta hace pocos años no se disponía de bloqueantes selectivos de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico. Por todo ello, en la presente Tesis, se estudian los efectos antiisquémicos del bloqueo farmacológico de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico de corazón de conejo mediante la administración de un bloqueante selectivo: el ácido ciclopiazónico (Seidler, 1989).

El carácter multifactorial de los mecanismos implicados en el daño celular durante la isquemia y perfusión dificulta la elaboración de modelos experimentales para su estudio *in vivo*. La selección del modelo experimental más adecuado para los objetivos del estudio implica conocer las limitaciones de las diversas técnicas descritas. El modelo del tabique interventricular de corazón de conejo, aislado y perfundido arterialmente

según la técnica descrita por Langer y Brady (1968), es una preparación óptima para nuestros propósitos: el miocardio de conejo presenta grandes similitudes con el humano, además, la técnica empleada permite una correcta valoración del daño desde el punto de vista funcional, estructural y bioquímico (Reimer y Jennings, 1986).

En los capítulos de introducción se hace un repaso a las bases estructurales sobre las que asientan la contracción y la relajación miocárdicas, y se describe la secuencia de acontecimientos que determinan el acoplamiento excitación-contracción, haciendo especial referencia a la regulación de los flujos de calcio transmembrana y entre los diversos compartimentos subcelulares. Los mecanismos fisiopatológicos consecuencia de la isquemia y reperfusión miocárdicas son analizados a continuación. En este último apartado se presta especial atención al papel del calcio como posible responsable máximo del daño celular asociado a la reperfusión. Por último, se presenta un capítulo dedicado a los inhibidores de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico. Acto seguido, y en base a los conocimientos indirectos que involucran al calcio del retículo sarcoplásmico en la fisiopatología de la isquemia y reperfusión miocárdicas, se justifica el planteamiento del presente estudio y se pormenorizan los objetivos del mismo.

I.1.- BASES ESTRUCTURALES DE LA CONTRACTILIDAD MIOCARDICA.

Las paredes musculares del corazón de mamífero están compuestas por una red ramificada de fibras o células musculares. Cada célula muscular está compuesta mayoritariamente por fascículos de miofilamentos, cada uno de ellos organizado en subunidades repetidas denominadas sarcómeros, las cuales confieren al músculo cardíaco su condición de estriado al observarlo con microscopía óptica. El estudio con microscopio electrónico permite comprobar que el sarcómero está compuesto por miofilamentos gruesos (10 nm de espesor) y delgados (5 nm), formando los filamentos gruesos de miosina la banda A oscura y los filamentos de actina las bandas I claras. Las bandas I de cada sarcómero adyacente están unidas en la línea Z (Figura 1). En un corte transversal a través de la banda A se puede ver que existe una superposición de filamentos gruesos y delgados, formando éstos últimos un dibujo hexagonal alrededor de cada filamento de miosina, mientras que en un corte transversal la banda I muestra solamente filamentos delgados conteniendo actina, tropomiosina y troponinas.

Los filamentos de actina y miosina se deslizan en un movimiento de avance y retroceso durante la contracción y la relajación. Este modelo de filamentos deslizantes fue elaborado por Huxley en 1958 (Huxley, 1974) siendo confirmado por numerosos estudios experimentales (Pollack, 1983).

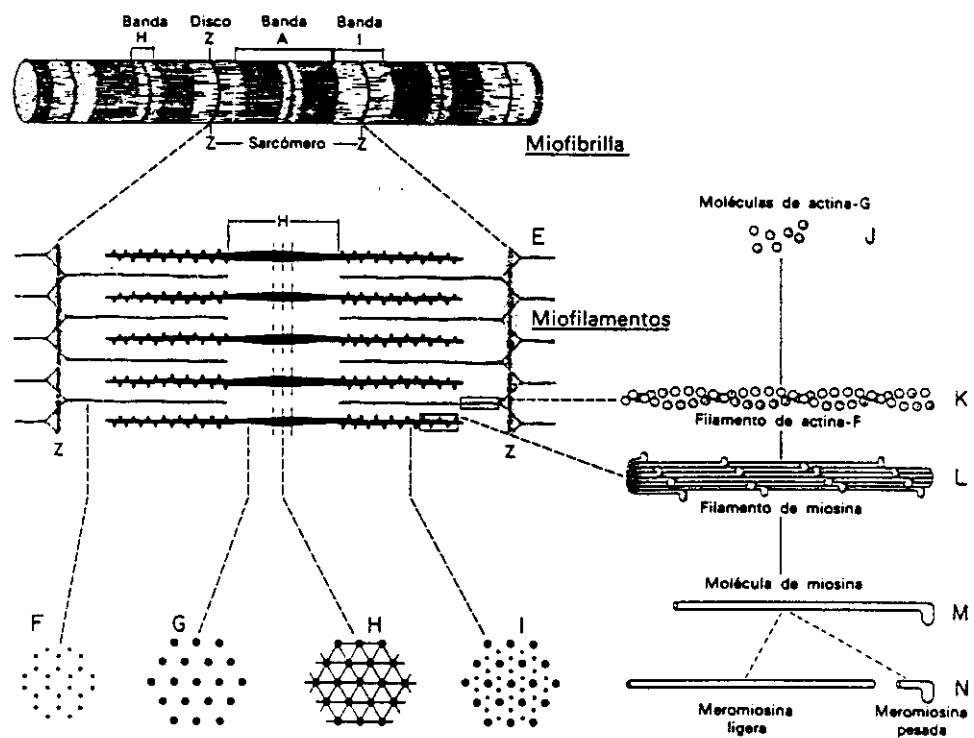


Figura 1.- Esquema de la organización del aparato contráctil a nivel de músculo estriado.

Hoy día se entiende la contracción miocárdica como el resultado de la interacción de seis proteínas (Tabla 1). Reunidas in vitro expresan las propiedades que caracterizan la contractilidad miocárdica: hidrolizan ATP para liberar energía química, experimentan cambios físicoquímicos que manifiestan el desarrollo de tensión y la capacidad de acortamiento en el músculo vivo, y sus interacciones son controladas por el calcio iónico, reflejando el papel fundamental de este ión en el acoplamiento excitación-contracción.

PROTEINA	LOCALIZACION	PESO MOLECULAR APROXIMADO	PROPIEDADES BIOQUÍMICAS
<i>Miosina</i>	Filamento grueso	480.000	Hidroliza ATP Interacciona con la actina
<i>Actina</i>	Filamento fino	41.700	Activa la ATPasa de miosina Interacciona con la miosina
<i>Tropomiosina</i>	Filamento fino	67.000	Modula la interacción actina-miosina
<i>Troponina C</i>	Filamento fino	18.400	Liga calcio
<i>Troponina I</i>	Filamento fino	23.500	Inhibe las interacciones actina-miosina
<i>Troponina T</i>	Filamento fino	38.000	Une el complejo troponina al filamento fino

Tabla 1.- PROTEINAS CONTRACTILES.

I.1.1.- MIOSINA.

Se trata de una molécula grande con un tallo filamentososo que mantiene la rigidez estructural del filamento grueso, y una cabeza globular donde se concentra su actividad enzimática. Su peso molecular aproximado es de 480.000 daltons. Consta de dos cadenas pesadas de 200.000 dalton, dos alfa-hélices enrolladas una sobre la otra, que constituyen el tallo y las cabezas globulares, y de dos pares de cadenas ligeras de 19.000 y 27.000 dalton, localizadas en las regiones "bisagra" o puntos de flexibilidad entre las cabezas y el tallo.

Existen diferentes isoformas de cadenas pesadas tanto en diversos músculos como en distintas localizaciones del mismo músculo o incluso varían según las etapas del desarrollo. Asimismo, juegan un importante papel en los procesos de adaptación crónica al envejecimiento, sobrecarga o endocrinopatías (Katz, 1990). Hoy se considera que las cadenas pesadas son el principal determinante de la actividad ATPasa *in vitro* y de la velocidad de acortamiento en el músculo vivo.

También existen diversas isoformas de cadenas ligeras variando en función de su localización, edad o estado patológico (Wankerl *et al*, 1990). Todas son proteínas ligadoras de calcio.

La molécula de miosina presenta dos importantes propiedades biológicas: (a) actividad ATPasa que hidroliza el fosfato terminal del ATP

liberando su energía química, y (b) capacidad de unión a la actina, expresión in vitro de las interacciones entre los filamentos finos y gruesos en el sarcómero que son responsables de la contracción muscular. Ambas propiedades se localizan a nivel de las cabezas globulares.

I.1.2.- ACTINA.

Mucho menor que la miosina, con un peso molecular de 41.700 dalton. Se purificó por vez primera en 1942 y debe su nombre a su capacidad para "activar" la ATPasa de la miosina. El monómero o actina globular (actina-G) polimeriza formando actina fibrosa (actina F). Esta es una doble cadena helicoidal que se cruza cada 13-14 monómeros, constituyendo los filamentos finos del sarcómero.

Presenta dos propiedades biológicas que implican directamente al proceso de contracción: activa la capacidad ATPasa de la miosina e interactúa con la miosina. Puede combinarse con una amplia serie de proteínas, no sólo la miosina, y algunas de ellas juegan un importante papel en la regulación de la contracción muscular, como el caldesmon en el músculo liso, o el complejo troponina-tropomiosina en el músculo cardíaco y esquelético.

I.1.3.- TROPOMIOSINA.

Es una molécula filamentosa de 68.000 dalton constituída por dos cadenas peptídicas helicoidales unidas por un enlace disulfuro. Se sitúa en los surcos de la doble hélice de actina. Presenta dos dímeros alfa y beta. En el músculo cardíaco de pequeños mamíferos se encuentra formada por dos dímeros alfa, mientras que los corazones de los grandes mamíferos presentan cantidades significativas de la subunidad beta. Además, la proporción de subunidades beta aumenta con el desarrollo, y en una serie de especies se correlaciona de forma inversamente proporcional con la frecuencia cardíaca basal (Humphreys y Cummins, 1984). La tropomiosina regula las interacciones entre actina y miosina, pudiendo activar o inhibir en función del estado de la interacción actina-miosina. Además, junto con la troponina media en la señal iniciada por el aumento de calcio intracitosólico activando las interacciones actina-miosina responsables de la contracción muscular.

I.1.4.- TROPONINA.

Constituída a su vez por tres proteínas. La troponina I (23.500 d), junto con la tropomiosina, regula las interacciones actina-miosina, en este caso inhibiéndolas. La troponina T (38.000 d) liga el complejo troponina a la tropomiosina. La troponina C (18.400 d) presenta cuatro secuencias de aminoácidos que forman parte de la familia de proteínas ligadoras de

calcio. Estas secuencias son de dos tipos: unas calcio-específicas y otras que también ligan magnesio (sitios calcio-magnesio) y de hecho suelen estar ocupados por este ión cuya concentración intracelular es varios órdenes de magnitud superior a la del calcio, de forma que no juegan ningún papel en el acoplamiento excitación-contracción.

Estos tres componentes se encuentran a lo largo de los filamentos finos del sarcómero junto a la actina y la tropomiosina (Figura 2). Las proteínas reguladoras, en ausencia de calcio, se comportan como proteínas inhibitorias, mientras que el calcio inicia la contracción revirtiendo este efecto inhibitorio.

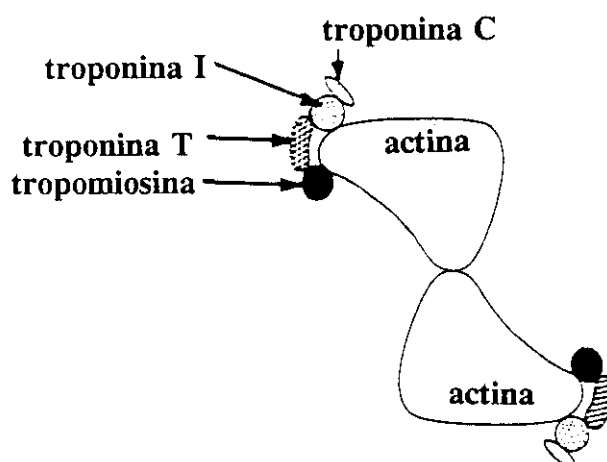


Figura 2.- Corte transversal del filamento fino mostrando la relación entre actina, tropomiosina y los tres componentes del complejo troponina.

I.1.5.- TEORIA DEL DESLIZAMIENTO.

La teoría del deslizamiento sostiene que en cada ciclo de contracción-relajación los filamentos delgados de actina se desplazan con respecto a los gruesos (Huxley, 1974). A nivel de los puentes transversales se generan fuerzas que actúan a pequeña distancia. Las cabezas de las moléculas de miosina se ligan al sitio de unión de la actina F, y mediante un cambio de conformación la arrastran hacia el centro del sarcómero. El desdoblamiento del ATP por la ATPasa activada por calcio proporciona la energía. Durante el ciclo de contracción-relajación se produce la unión y separación de los puentes transversales a los filamentos de actina. En la relajación completa no hay unión y en el estado de contracción la unión es completa (Pollack, 1983).

La regulación del ciclo depende de la concentración del calcio y de las proteínas reguladoras tropomiosina y troponinas. Cuando el Ca^{2+} intracitosólico aumenta por encima de 10^{-6} M se produce la unión de éste a la troponina C generando una serie de cambios conformacionales en las proteínas reguladoras que dejan expuestos los sitios activos de la actina en los filamentos finos. La interacción de estos sitios activos con los puentes transversos de miosina inicia los procesos que darán lugar a la contracción miocárdica: la transformación de la energía química del ATP en energía mecánica.

Desde la década de los 60 parecía claro que el papel del ATP en el

proceso contráctil consistía exclusivamente en proporcionar la energía necesaria para la fase de contracción, mientras que la relajación sería un proceso pasivo. Hoy día ha aumentado considerablemente el número de pasos conocidos de la secuencia de reacciones químicas responsables de la contracción muscular. El ATP y sus metabolitos interaccionan con las proteínas contráctiles en varios pasos de este proceso; unos corresponden a la fase de contracción y otros a la fase de relajación. De hecho, globalmente la fase de relajación consume más energía que la fase de contracción, requiriéndose altas concentraciones de ATP para interaccionar con el complejo actomiosina dando lugar a miosina-ATP y actina en la fase de relajación. Sin embargo, la formación del complejo actomiosina (responsable de la contracción) requiere concentraciones de ATP mucho menores (Katz, 1992). Esto explicaría, entre otros fenómenos, la afectación precoz del lusitropismo durante la isquemia miocárdica antes de manifestarse una disminución del inotropismo (Hirota, 1980).

I.2.- ACOPLAMIENTO EXCITACION-CONTRACCION.

El acoplamiento excitación-contracción comprende la secuencia de pasos que se inicia cuando el potencial de acción despolariza la membrana plasmática, y finaliza con la unión del calcio a la troponina C, el receptor de calcio de las proteínas contráctiles. En los últimos años se incluyen también en este concepto los procesos que controlan la relajación miocárdica (Barry y Bridge, 1993).

Ringer en el siglo XIX ya descubrió que cuando se extraía el calcio del medio en que se hallaba sumergido un corazón de rana aislado, cesaba la contracción de éste. Hoy sabemos que el ión Ca^{2+} es el eslabón clave del acoplamiento de la excitación eléctrica del músculo con su contracción mecánica.

Los movimientos o flujos de calcio entre al menos cinco regiones miocárdicas permiten explicar el proceso de contracción y relajación cardíaco. Estos son: espacio extracelular, citosol, retículo sarcoplásmico, troponina y mitocondria (Figura 3).

La concentración de calcio iónico en el fluido extracelular es de 1 mM, mientras que la concentración necesaria para saturar la troponina es unas 100 veces menor ($< 10 \mu\text{M}$), y la concentración de calcio intracitosólico en el corazón en reposo oscila entorno a $0.2 \mu\text{M}$). La magnitud de este gradiente y las rápidas variaciones del mismo con la

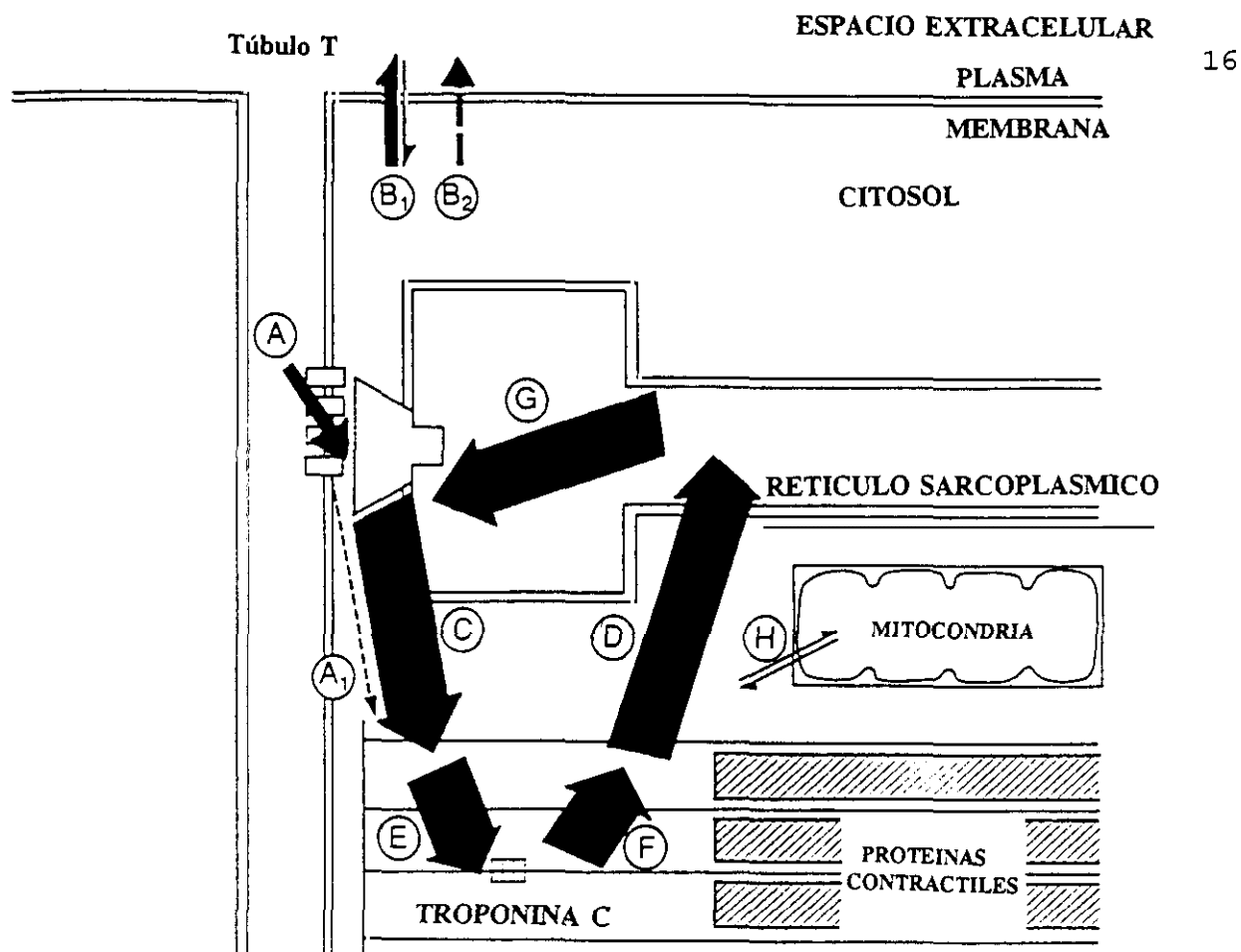


Figura 3.- Diagrama esquemático que muestra los principales flujos de calcio involucrados en el acoplamiento excitación-contracción. El grosor de las flechas indica la magnitud del flujo. La dirección de las flechas describe el carácter activo o pasivo de los mismos: flechas hacia abajo indican flujos de calcio pasivos, a favor de gradiente, mientras que flechas hacia arriba definen los flujos de calcio realizados con consumo de energía. A) Entrada de Ca^{2+} a través de los canales de calcio de membrana; la mayor parte se emplea en disparar la liberación de Ca^{2+} por parte del RS a nivel de la hendidura diádica, pero una pequeña proporción (A_1) puede activar directamente las proteínas contráctiles. B₁) Intercambiador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$, con posibilidad de funcionar en sentido reverso. B₂) Bomba de calcio del sarcolema. C) Salida de Ca^{2+} del RS a través de los canales de salida de Ca^{2+} del RS. D) Entrada de Ca^{2+} al RS a través de la Ca^{2+} -ATPasa del RS. E) La troponina C liga Ca^{2+} activándose el proceso contráctil. F) La troponina C disocia el Ca^{2+} previamente ligado iniciándose la fase de relajación. G) El calcio que entra al RS se almacena a nivel de las cisternas subsarcolémicas ligándose a la calsecuestrina y a otras proteínas ligadoras de Ca^{2+} . H) Movimientos de entrada y salida de Ca^{2+} a nivel mitocondrial.

(Modificado de Katz, 1992)

secuencia de contracción-relajación nos dan idea del extraordinario grado de ajuste y control que debe existir entre los diversos compartimentos mencionados. Se estima, de hecho, que el consumo de energía empleado en la regulación de los movimientos del calcio alcanza un 25% del gasto total de energía celular (Langer, 1992).

Desde la superficie de la célula se proyectan hacia su interior estrechas prolongaciones del sarcolema que penetran en el espacio intracelular. Son los denominados túbulos transversales o túbulos T, que desembocan en las bandas Z de los sarcómeros conduciendo hacia el interior la despolarización eléctrica (Figura 4). Por otro lado, el retículo sarcoplásmico constituye un sistema tubular aparte que rodea los sarcómeros y contiene calcio en alta concentración. Este retículo no se conecta directamente con el sarcolema o los túbulos T, pero sus estructuras saculares aplanadas (cisternas) se aponen contra el sarcolema o los túbulos T. En el músculo cardíaco donde uno o dos sarcotúbulos laterales envuelven un túbulo transversal, el aspecto en corte transversal es el de una "díada" o "tríada". Esta díada o tríada es uno de los puntos claves en la interpretación actual del acoplamiento excitación-contracción (Langer y Peskoff, 1996).

El proceso de acoplamiento excitación-contracción se inicia cuando un potencial de acción despolariza la membrana celular. Esta señal eléctrica se genera por el paso de iones a través de canales de membrana invirtiendo el potencial eléctrico transmembrana. Primero entra el sodio

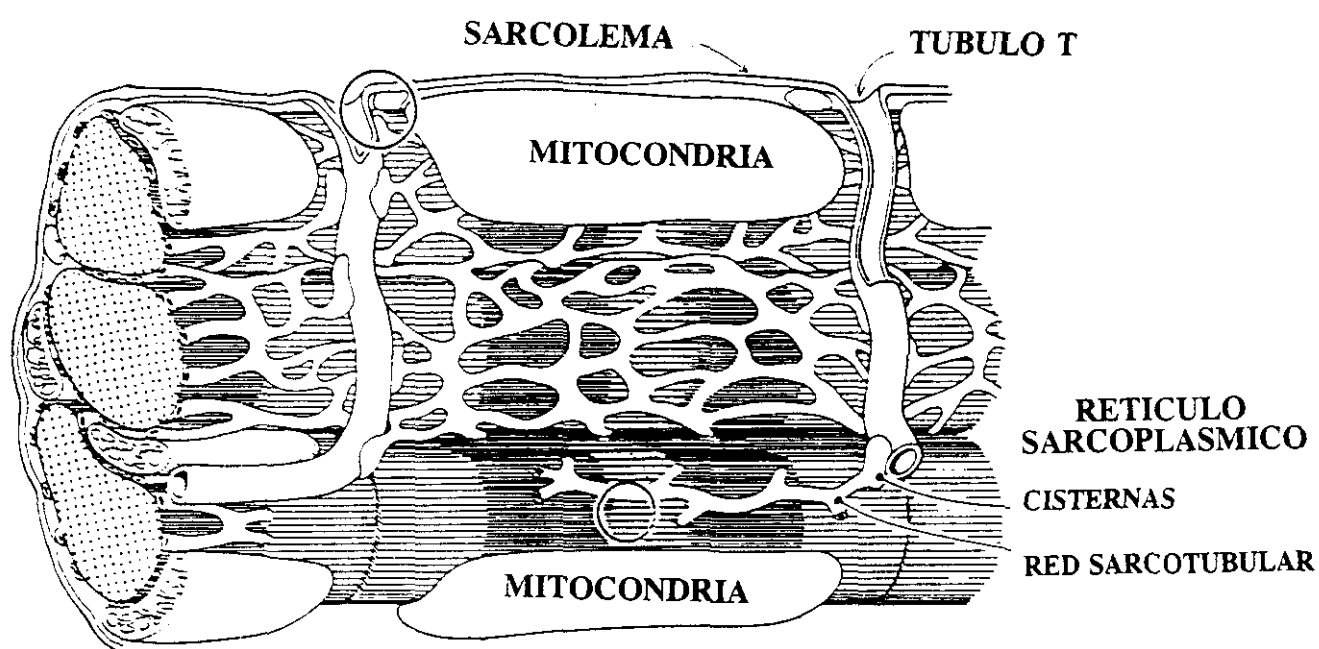


Figura 4.- Estructura de la célula miocárdica. Importancia relativa en su composición respecto al volumen celular total de las miofibrillas (47%), mitocondrias (36%) y retículo sarcoplásmico (3,5%) (Page, 1978). Se observa la distribución de los túbulos T a nivel de las líneas Z de los sarcómeros y su estrecha relación con las cisternas subsarcolémicas del RS.

(corriente rápida hacia dentro); la neutralización de la electronegatividad del interior celular por la entrada del sodio causa la apertura de los canales de calcio voltaje-dependientes y el cierre de los canales de potasio generando una segunda corriente, esta vez lenta, de calcio. Hacia el final del potencial de acción el influjo de calcio cesa y la repolarización va acompañada por la entrada de potasio, encargándose la $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$ de membrana de mantener el potencial eléctrico durante la diástole transportando sodio hacia el exterior en intercambio con potasio con una estequiometría $3 \text{ Na}^+ : 2 \text{ K}^+$.

I.2.1.- MECANISMOS DE ENTRADA DE Ca^{2+} A TRAVES DEL SARCOLEMA.

En las células cardíacas existen dos tipos fundamentales de canales de calcio voltaje-dependientes cuya activación varía según el rango de potencial de membrana: *canales lentos o tipo L ("long-lasting")* y *canales T ("transient")* (McCleskey *et al*, 1986). Los *canales T* tienden a localizarse en células con actividad marcapasos (nodo sinusal y nodo aurículo-ventricular fundamentalmente), pero también están presentes en miocitos ventriculares (Mitra y Morad, 1986).

Más recientemente se ha sugerido la existencia de *canales de goteo de calcio o tipo B ("background")* en el sarcolema de células miocárdicas de rata (Rosenberg *et al*, 1988; Coulombe *et al*, 1989). Estos canales no

requieren despolarización de membrana para activarse y no se bloquean con los antagonistas clásicos de los canales tipo L. Su significado fisiológico no está aún bien definido, aunque podrían jugar un papel en la conductancia al calcio durante la fase de reposo. Algunos postulan un posible papel como contribuyentes a la sobrecarga de calcio en ciertas condiciones patológicas (Wang *et al*, 1995).

El canal de Ca tipo L es un complejo oligomérico constituido por cinco subunidades. Una característica farmacológica importante de estos canales es la presencia de un receptor de alta afinidad para ligandos de dihidropiridinas. Estos ligandos pueden funcionar tanto como agonistas como antagonistas. Antagonistas como la nifedipina, cuando se unen al receptor bloquean la actividad del canal. Por su parte, el Bay K8644 es un agonista del receptor de dihidropiridinas y aumenta la corriente de Ca^{2+} a través de estos canales (Sanguinetti *et al*, 1986).

Existen también bloqueantes inorgánicos de estos canales lentos de Ca^{2+} , como el Mg^{2+} , el Mn^{2+} y el Cd^{2+} . Aunque el magnesio forma parte del fluido extracelular normal, puede bloquear canales de Ca^{2+} cuando se emplea a altas concentraciones (Lansman *et al*, 1986). El manganeso es también un potente bloqueador de canales de calcio, aunque a concentraciones mucho menores (Kass y Tsien, 1975).

La entrada de Ca^{2+} durante la fase 2 del potencial de acción desempeña, al menos, cinco papeles clave:

1.- Proporciona carga positiva al interior celular contribuyendo así a la *despolarización celular*.

2.- Activa la apertura de los canales de potasio, con lo cual se *inicia la repolarización*.

3.- *Suministra calcio activador* para unirse a la troponina C e iniciar la contracción. Sin embargo, en la mayoría de los mamíferos esta contribución resulta insuficiente por sí sola para iniciar tal proceso, suponiendo apenas 1/5 del calcio total necesario para activar el proceso contráctil (Fabiato, 1983). El resto lo aportará el retículo sarcoplásmico.

4.- Proporciona *calcio para ser almacenado* en el retículo sarcoplásmico.

5.- *Activa la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico* (Fabiato, 1983), (Beuckelmann y Weir, 1988).

I.2.2.- MECANISMOS DE SALIDA DE CALCIO A TRAVÉS DEL SARCOLEMA.

La entrada de calcio durante el potencial de acción es un proceso realizado a favor de gradiente, por el contrario, la salida del calcio durante la diástole se realiza contra gradiente químico y eléctrico, por lo que requiere consumo de energía.

La célula miocárdica extruye el calcio a través de dos mecanismos diferentes: la bomba de Ca^{2+} -ATP-dependiente y el intercambiador Na^{+} - Ca^{2+} .

I.2.2.1.- BOMBA DE Ca^{2+} -ATP-DEPENDIENTE.

Fue identificada por vez primera en el sarcolema de miocitos cardíacos de perro por Caroni y Carafoli (1980). Es similar a la bomba de Ca^{2+} del RS, si bien ésta es mayor y se regula de forma diferente (Caroni *et al*, 1983). Tiene un pm de 134.000 kd. Se encuentra presente en la mayoría de las células del organismo, y emplea la energía resultante de la hidrólisis de una molécula de ATP para transportar una molécula de Ca^{2+} contra gradiente de concentración (Carafoli, 1992). Mientras que la bomba de Ca^{2+} del RS se regula por la protein kinasa A, estimulándose a través de una reacción de fosforilación, la bomba de Ca^{2+} del sarcolema se activa por la unión del complejo calcio-calmodulina. Esto hace que la entrada de calcio estimule, por retroalimentación negativa, la salida del mismo a través de la bomba de Ca^{2+} del sarcolema.

En cualquier caso, se trata de una bomba de alta afinidad por el calcio pero de baja capacidad de transporte. De hecho, en la mayoría de las células no excitables consituye el único mecanismo para extruir calcio.

Pero en células excitables como las cardíacas existe un segundo sistema para extraer calcio: el intercambiador $\text{Na}^+ \text{-Ca}^{2+}$.

En miocitos cardíacos cultivados, se ha calculado que el índice de extrusión de calcio por parte de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana es la décima parte en relación con la del intercambiador $\text{Na}^+ \text{-Ca}^{2+}$ para un rango de concentraciones de calcio citosólico fisiológico (Barry *et al*, 1985). Por todo ello, aunque la Ca^{2+} -ATPasa de membrana pueda contribuir a mantener la concentración de calcio intracelular en miocitos en reposo, su importancia en relación con el intercambiador parece ser menor.

I.2.2.2.- INTERCAMBIADOR $\text{Na}^+ \text{-Ca}^{2+}$.

Utiliza la energía del gradiente electroquímico de Na^+ (mantenido por la $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPasa}$) a través de la membrana para movilizar el calcio contra gradiente. Es electrogénico, ya que mantiene una estequiometría de $3\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$. Tiene mayor capacidad y menor afinidad que la bomba de Ca^{2+} , siendo responsable de un 80% del flujo de calcio hacia el exterior celular (Lederer *et al*, 1990; Cannell, 1991).

El intercambiador $\text{Na}^+ \text{-Ca}^{2+}$ es voltaje-sensible. Si el potencial de membrana es más negativo que el potencial de equilibrio (alrededor de -40 mV), como ocurre normalmente en el miocito en reposo, el

intercambiador funciona en sentido "anterógrado" introduciendo Na^+ y sacando Ca^{2+} de la célula (Kimura *et al*, 1986). Durante la sístole cardíaca, con la célula despolarizada (interior con carga positiva), funciona en sentido reverso, favoreciendo la entrada de calcio. Algunos autores han sugerido que el calcio que hace su entrada por esta vía podría ser el que estimula la liberación del calcio del RS (Le Blanc y Hume, 1990), sin embargo, los últimos estudios indican que el calcio transportado por los canales de calcio es varias veces más efectivo en estimular la liberación de calcio del RS que el intercambiador $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ (Sham *et al*, 1995).

La actividad del intercambiador puede ser regulada, además de por el voltaje y la $[\text{Na}^+]_i$, por otra serie de mecanismos. De hecho, la acidosis inhibe el intercambiador (Philipson *et al*, 1982), y el déficit severo de ATP produce el mismo efecto, disminuyendo la afinidad del intercambiador por el Ca^{2+} (Haworth *et al*, 1987).

I.2.3.- FUNCION DEL RETICULO SARCOPLASMICO.

La función principal del RS es la regulación de la concentración del calcio intracitosólico. No sólo aporta el mayor porcentaje de calcio para ligarse a la troponina C durante la contracción, sino que también lo recapta y almacena, jugando así un papel esencial en el proceso de relajación.

La membrana del RS es una bicapa lipídica que contiene una serie de proteínas intrínsecas. Desde el punto de vista estructural y funcional se distinguen dos zonas: las cisternas subsarcolémicas, que contienen los canales de salida de Ca^{2+} y se sitúan alrededor de los túbulos T y junto al sarcolema; y la red sarcotubular, con la Ca^{2+} -ATPasa del RS, distribuída alrededor de las proteínas contráctiles en el centro del sarcómero (Langer, 1992).

La "díada", verdadera unión funcional entre el sistema T y las cisternas subsarcolémicas, es uno de los puntos básicos en la comprensión de la regulación de la dinámica del calcio intramiocárdico (Figura 5). Ahí quedan enfrentados el canal lento de calcio del sarcolema (también denominado receptor de dihidropiridinas por ser el punto de actuación de estos antagonistas del calcio), y la proteína "pie" ("foot protein") o receptor de ryanodina, que no es otro que el canal de salida de Ca^{2+} del RS (Langer y Peskoff, 1996).

I.2.3.1.-- SALIDA DE Ca^{2+} DEL RETICULO SARCOPLASMICO. CANALES DE Ca^{2+} .

Los canales de salida de Ca del RS ("foot-protein") son estructuras tetraméricas que se proyectan a modo de "pies" en el espacio comprendido entre la cisterna subsarcolémica y el túbulo-T (hendidura diádica). Estos canales han sido clonados, y presentan 4.969 aminoácidos

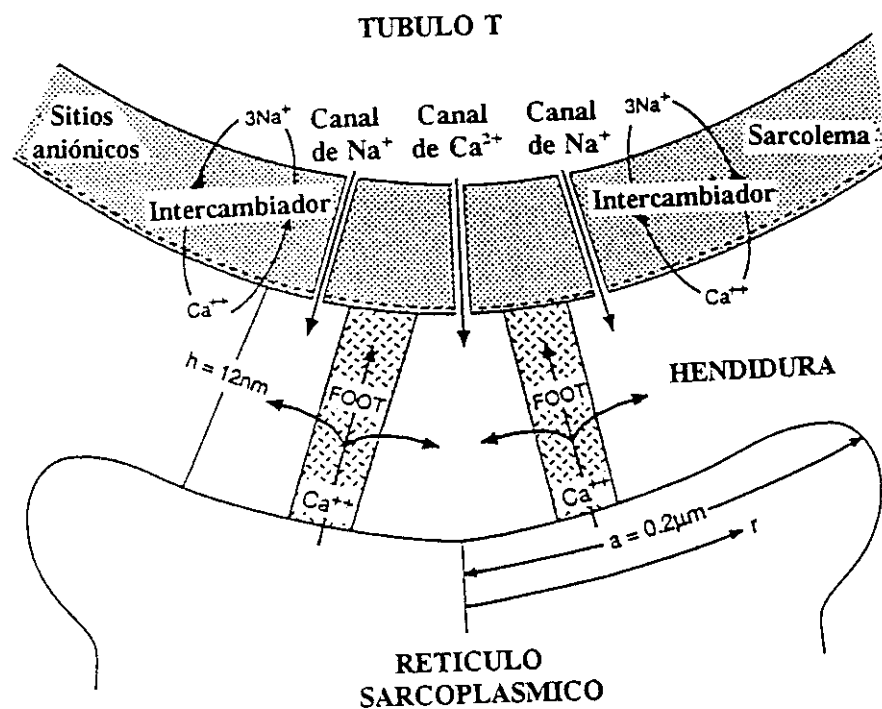


Figura 5.- Representación esquemática del modelo de hendidura diádica, en corte transversal al túbulo T y RS, tal y como proponen Langer y Peskoff (1996).

con un pm de 564.711d (Otsu *et al*, 1990). Las cuatro subunidades rodean un canal central que parece conectar con cuatro canales radiales (Block *et al*, 1988; Saito *et al*, 1988). Se ha comprobado que existen varios tipos de canales de salida de Ca del RS, de forma que constituyen una familia de isoformas (Borgatta *et al*, 1991).

Se han formulado diversas teorías para explicar la liberación de calcio del RS: acoplamiento eléctrico con el potencial de membrana, acoplamiento mecánico entre proteínas del sistema T y del RS, y la liberación de calcio calcio-inducida. La última es sin duda la más aceptada; Fabiato postuló que la entrada de una pequeña cantidad de calcio a través de la membrana plasmática (canales lentos de Ca^{2+}) induciría una liberación mucho mayor de calcio activador del RS, probablemente por la unión del calcio a un receptor situado en la supercie citosólica del RS (Fabiato, 1983; Fabiato y Fabiato, 1975).

Este canal puede abrirse también por la acción de metilxantinas, como la cafeína (Meissner y Henderson, 1987) y tiene alta afinidad por el alcaloide ryanodina. A bajas concentraciones ($< 10 \mu\text{mol/L}$), la ryanodina induce la apertura del canal (Rousseau *et al*, 1987); mientras que a mayores concentraciones lo bloquea por completo (Meissner, 1986). El rojo rutenio es otro potente inhibidor de la salida de Ca^{2+} del RS (Benzi y Lerch, 1992).

En miocitos en reposo expuestos a bajas concentraciones de

ryanodina se provoca una deplección completa del RS (Bers *et al*, 1987). En estas condiciones, la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de membrana tipo L (y quizás también a través del intercambiador $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$) no consigue desencadenar una contracción. Esta observación sugiere que, en miocitos cardíacos de mamífero, la mayor parte del calcio activador necesario para el acoplamiento excitación-contracción proviene del RS. Por otra parte, no todo el calcio contenido en el RS se libera en cada contracción, sino que el grado de liberación de este depósito parece estar en íntima relación con la cantidad de calcio que entra por los canales de membrana (Fabiato, 1989).

El canal de salida de Ca^{2+} del RS puede presentar cuatro estadios funcionales: a) Abierto, como consecuencia del aumento del calcio libre citosólico y de su unión al sitio activador; b) Cerrado, como consecuencia de un gran incremento en el calcio citosólico resultante de la salida de Ca^{2+} del RS y de su unión al sitio inactivador; c) Refractario y d) Activable (Langer, 1992).

Este canal presenta, además, sitios para fosforilación, unión de ATP y unión de calmodulina. La importancia de estos mecanismos en la regulación del canal no está clara, si bien parece que la calmodulina reduce la duración del tiempo de apertura del canal (Rousseau *et al*, 1987).

I.2.3.2.- ENTRADA DE Ca^{2+} AL RETICULO SARCOPLASMICO. BOMBA DE Ca^{2+} ATP-DEPENDIENTE.

El proceso de relajación miocárdica implica la disminución de la concentración de calcio intracitosólico. Ya se señaló que el proceso de extrusión de calcio hacia el espacio extracelular resulta insuficiente para explicar la dinámica de la relajación. De hecho, la relajación requiere la recaptación de calcio por el RS. La Ca^{2+} -ATPasa del RS (SERCA) realiza este transporte contra gradiente de concentración, y tiene una afinidad por el calcio lo bastante alta como para reducir la concentración de calcio intracitosólico a niveles suficientemente bajos como para permitir la disociación del calcio unido a la troponina C.

La bomba de Ca^{2+} del RS es una proteína con un peso molecular de 100.000-110.000 d, menor que la bomba de Ca^{2+} del sarcolema, y representa el 40% de las proteínas presentes en el RS cardíaco (Tada *et al*, 1978). Presenta diversas isoformas codificadas al menos por tres genes (Zerain-Herzberg *et al*, 1990), y parece actuar como un dímero. Esta Ca^{2+} -ATPasa cicla a través de un proceso de fosforilación-defosforilación, transportando en cada ciclo dos átomos de Ca^{2+} por cada ATP hidrolizado a $\text{ADP} + \text{P}_i$. El flujo de cationes Ca^{2+} a través de la membrana debiera generar un gradiente eléctrico, sin embargo, el RS es permeable a una gran variedad de aniones y el flujo concurrente de aniones cloruro y fosfato evitan que se cree un potencial transmembrana (Katz, 1992).

Su regulación en el músculo cardíaco depende del fosfolamban, una proteína de unos 5500-6000 d y 52 aminoácidos que parece funcionar como un pentámero (Fujii *et al*, 1987). La defosforilación del fosfolamban inhibe la bomba de calcio, mientras que su fosforilación suprime tal inhibición (Wegener y Jones, 1984). En el corazón la fosforilación del fosfolamban tiene lugar vía AMPc, segundo mensajero intracelular, o por una proteinkinasa Ca^{2+} /calmodulina dependiente, si bien ambos sistemas podrían actuar secuencialmente activándose la proteinkinasa al alcanzarse altos niveles de AMPc (Wegener *et al*, 1989). Su defosforilación, y por tanto inhibición de la bomba de Ca, se realiza por medio de las fosfoprotein-fosfatasas, un grupo complejo de enzimas altamente reguladas (Kranias *et al*, 1988).

Se ha sugerido que algunas de las alteraciones en contractilidad miocárdica observadas durante el desarrollo y en ciertos estados patológicos podrían estar relacionadas con modificaciones en las propiedades del RS. La cantidad de RNAm codificante para la SERCA 2 en ratas presenta su máximo en el momento del nacimiento y desciende en la última etapa de la vida (Lompré *et al*, 1994). La hipertrofia miocárdica severa inducida en modelos animales se acompaña igualmente de un descenso relativo en los niveles de RNAm codificante para la SERCA, asociado a su vez a un descenso en la captación de Ca^{2+} por parte del RS (Levitsky *et al*, 1991). Más recientemente, se ha propuesto que el descenso en los niveles de RNAm codificante para la SERCA podría ser un marcador de la transición de la hipertrofia compensada

hacia el fracaso cardíaco terminal (Feldman *et al*, 1993).

I.2.3.3.- ALMACENAMIENTO DE CALCIO EN EL RETICULO SARCOPLASMICO. PROTEINAS LIGADORAS DE CALCIO.

Dentro del RS el calcio puede almacenarse en forma libre, ionizada, pero un porcentaje de éste queda unido a diversas proteínas ligadoras de calcio. La más importante es la *calsequestrina*, capaz de ligar uno 50 moles de calcio por mol de proteína, y que podría jugar un importante papel en el acoplamiento excitación-contracción (Barry y Bridge, 1993). También merecen citarse la *calreticulina* y la "*proteína ligadora de calcio rica en histidina*" (Mitchell *et al*, 1988).

I.2.3.4.- IMPORTANCIA RELATIVA DEL RETICULO SARCOPLASMICO SEGUN ESPECIES.

La contribución del RS para proporcionar el Ca^{2+} involucrado en la actividad contráctil varía entre especies y en función de la etapa del desarrollo en que se encuentren. El orden de dependencia relativa del calcio liberado por el RS sería: ventrículo de rata adulta > aurícula de conejo > ventrículo de conejo > ventriculo de rana (Bers, 1985). Las diferencias entre el ventrículo de rata y el de conejo quedan de manifiesto por el hecho de que la ryanodina disminuye la fuerza contráctil en un

90% en la rata (por deplección del RS), mientras que en el ventrículo de conejo apenas alcanza el 10% (Rich *et al*, 1988). En ventrículo de cobayo (similar al de conejo) la ryanodina no alteraba la fuerza contráctil pero prolongaba la contracción un 50% (Lewartowski *et al*, 1990); esto indica que una función importante del RS a través de la liberación de calcio-inducida es aumentar la velocidad de contracción.

En definitiva, parece claro que el corazón de rata es totalmente dependiente del Ca^{2+} del RS para su contracción. El ventrículo de conejo y el de cobayo (similares al humano) pueden desarrollar actividad contráctil plena en ausencia del Ca^{2+} del RS (aunque a una frecuencia mucho menor) gracias a la activación de las proteínas contráctiles con el flujo de calcio a través del sarcolema. El corazón de rana, sin prácticamente RS, depende completamente de la entrada de Ca^{2+} exterior. Todo músculo cardíaco, a diferencia de lo que ocurre en el músculo esquelético, requiere al menos un pequeño flujo de calcio transmembrana, aunque sea tan solo para disparar la salida de Ca^{2+} del RS (Langer, 1992).

Por otra parte, también existen diferencias entre especies a la hora de valorar el papel del RS en la relajación miocárdica. Bassani *et al* (1994) han comparado la contribución proporcional de los diversos mecanismos de extrusión de Ca^{2+} intracitosólico en miocitos ventriculares aislados de rata y conejo. Estimaron que el calcio transportado por la Ca^{2+} -ATPasa del RS, intercambiador Na^{+} - Ca^{2+} y sistemas de transporte

lento (captación mitocondrial y Ca^{2+} -ATPasa sarcolémica) era 70, 28 y 2% en miocitos de conejo y 92, 7 y 1% en miocitos de rata, respectivamente. De esta forma, demuestran que la dominancia de la Ca^{2+} -ATPasa del RS respecto al intercambiador Na^{+} - Ca^{2+} es mucho más marcada en la rata (13 veces vs 2,5 veces en el conejo).

I.2.4.- FUNCION DE LA MITOCONDRIA.

Se estima que el contenido de calcio intramitocondrial supone un 20% del total celular (Langer *et al*, 1990). Sin embargo, el transporte de Ca^{2+} a este nivel parece ir dirigido tan solo a la regulación de enzimas mitocondriales responsables del metabolismo oxidativo (Gunter *et al*, 1994).

La entrada de Ca^{2+} se realiza contra un importante gradiente electroquímico. La afinidad por el calcio de la bomba de calcio mitocondrial es baja y su índice de transporte de calcio a concentraciones fisiológicas de calcio citosólico también es bajo, por ello es improbable que pueda jugar un papel importante en los flujos de calcio responsables del acoplamiento excitación-contracción.

La salida de Ca^{2+} tiene lugar por un intercambiador Na^{+} - Ca^{2+} , que, a diferencia del intercambiador del sarcolema, actúa como un sistema electroneutro. En cualquier caso, sea cual fuere la estequiometría

de la entrada o salida de Ca^{2+} a nivel mitocondrial ésta siempre sería compensada por la extrusión de hidrogeniones a través de la bomba de H^+ de la cadena respiratoria (Crompton, 1990).

La mitocondria podría jugar un papel "tamponando" un cierto porcentaje del calcio citosólico en situaciones de sobrecarga de calcio, como la provocada por la reperfusión tras la isquemia miocárdica (Williamson *et al*, 1983). Según el modelo teórico de Crompton, niveles citosólicos de $\text{Ca}^{2+} > 2 \mu\text{M}$ provocarían a su vez una severa sobrecarga de Ca^{2+} intramitocondrial alcanzando concentraciones superiores a 10 veces la basal (Crompton, 1990). Esta sobrecarga de calcio intramitocondrial induce una permeabilización de la membrana interna de la mitocondria para moléculas de peso molecular menor de 1000 d e inhibe la fosforilación oxidativa (Haworth y Hunter, 1980).

I.2.5.- FUNCION DEL SARCOLEMA.

El calcio presente en las células miocárdicas se encuentra altamente compartimentalizado. Mediante análisis de cinética de calcio se ha descrito un compartimento rápido, otro intermedio y un tercero lento y no intercambiable (Langer, 1994). El compartimento rápido (desplazable por el Lantano) representa un 38% del calcio celular total en miocitos ventriculares de rata, y se intercambia con una $t_{1/2} < 1\text{s}$ (Langer *et al*, 1990), constituyendo, por tanto, el compartimento de calcio más

importante y más rápidamente intercambiable.

A pesar de su tamaño, este compartimento ha sido difícil de localizar. Estudios con sarcolema aislado, proveniente de miocitos neonatales cultivados y separado mediante la técnica de disección con gas (Post y Langer, 1992) han permitido asociar este compartimento con la hoja interna del sarcolema (rica en fosfolípidos aniónicos con alta capacidad para ligar calcio) y con la hendidura diádica subsarcolémica.

Trabajos en miocitos ventriculares de rata expuestos a cafeína 10 mM (para depleccionar de Ca^{2+} el RS) y altas dosis de ryanodina (1 mM, para cerrar los canales de salida de Ca^{2+} del RS o "pies" de la hendidura diádica) muestran una disminución de un 25% en el contenido de Ca^{2+} del compartimento rápido (Langer y Rich, 1993). Este hecho sugiere que el Ca^{2+} de las cisternas laterales del RS contribuye y podría encontrarse en equilibrio con el calcio ligado a los fosfolípidos de la hoja interna del sarcolema.

Por otra parte, estudios realizados con cadmio y con dibucaína, agentes que desplazan el calcio de su unión al sarcolema pero que, a diferencia del lantano, no inhiben prácticamente el intercambiador $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$, sugieren una estrecha relación entre los niveles de Ca^{2+} en este compartimento y el funcionamiento del intercambiador $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$. Los sitios de unión de Ca^{2+} en la hoja interna del sarcolema servirían para retrasar la difusión del Ca^{2+} de la hendidura diádica una vez liberado

desde el RS. Esto mantiene la [Ca] en la hendidura dentro de niveles que permiten un óptimo funcionamiento de los intercambiadores $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ localizados en la misma hendidura (Wang *et al*, 1996).

I.3.- ISQUEMIA MIOCÁRDICA.

La isquemia miocárdica es consecuencia de la patología de las arterias coronarias, que no son capaces de mantener el clásico equilibrio entre aporte y demanda (Ardehali y Ports, 1990). Por tanto, conviene recordar que el tejido miocárdico es la víctima, y no el responsable o perpetuador en la patogénesis de la cardiopatía isquémica.

Como se puede observar en la Figura 6, los tres determinantes principales del consumo de oxígeno miocárdico son: frecuencia cardíaca, tensión desarrollada y contractilidad o estado inotrópico.

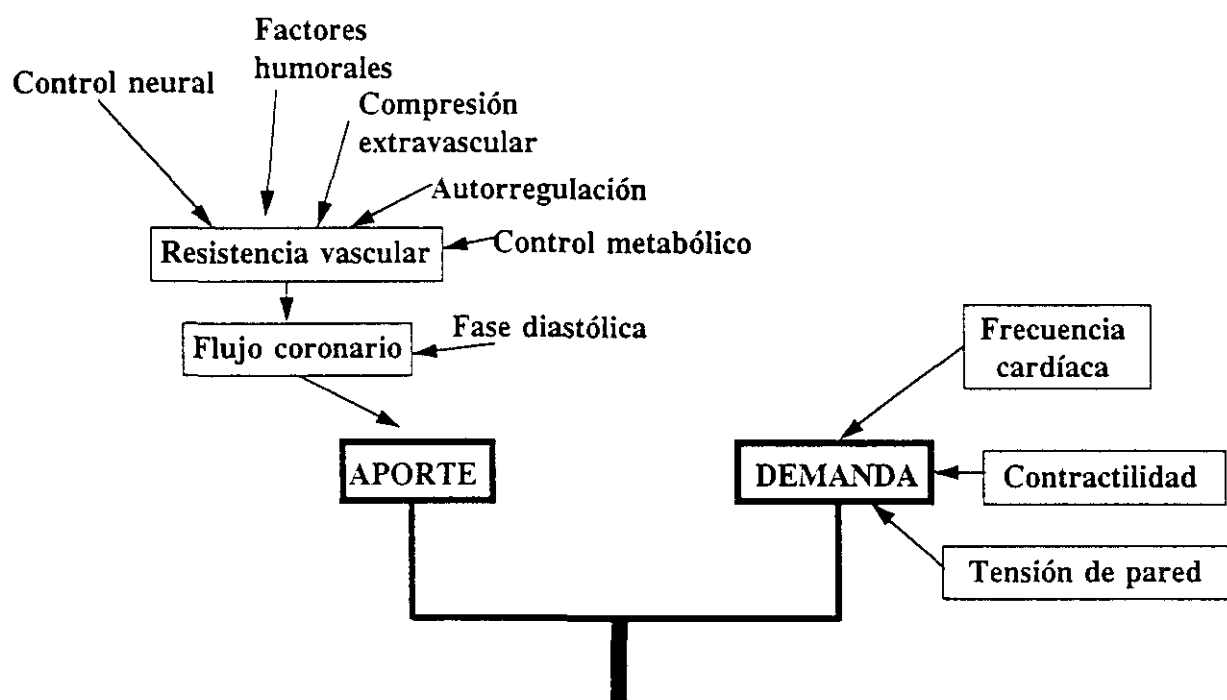


Figura 6.- Esquema de los principales factores determinantes del aporte y del consumo de oxígeno miocárdicos.

(Modificado de Ardehali y Ports, 1990)

La patología coronaria responsable de la aparición de cuadros de oclusión coronaria que den lugar a episodios de angina o a infartos, es fundamentalmente arterioesclerótica. La oclusión coronaria es producida habitualmente por un trombo formado sobre una placa ateroesclerótica complicada. Este trombo es el resultado final de un proceso complejo y dinámico donde interactúan como factores etiopatogénicos fundamentales la aterosclerosis coronaria, la rotura de placa, la agregación plaquetaria y el vasoespasmo (Fuster *et al*, 1992a; 1992b). En ocasiones se observan anginas e incluso infartos en pacientes con arterias coronarias angiográficamente normales, en estos casos el espasmo coronario juega el papel más importante (Nakamura *et al*, 1987). Aún más excepcionalmente se producen infartos de origen no ateroesclerótico ni vasospástico: arteritis, enfermedades de depósito, embolismo coronario, anomalías congénitas, contusión miocárdica, etc.

Otras circunstancias especiales, como la cirugía cardiovascular realizada con circulación extracorpórea o con parada cardiocirculatoria total con hipotermia profunda, suponen situaciones provocadas de daño miocárdico por isquemia. Por ello se requiere un mejor conocimiento de la fisiopatología de la isquemia/reperfusión miocárdicas con el fin de mejorar en lo posible las condiciones de conservación del corazón.

I.3.1.- FISIOPATOLOGIA DE LA ISQUEMIA MIOCARDICA.

I.3.1.1.-DIFERENCIAS ENTRE HIPOXIA E ISQUEMIA.

La hipoxia o hipoxemia es un estado de suministro insuficiente de oxígeno a los tejidos, a pesar de una correcta perfusión. La isquemia supone una reducción del aporte de oxígeno acompañada en este caso de una inadecuada perfusión tisular con el consiguiente déficit en la retirada de metabolitos de desecho.

Si bien la mayoría de los efectos de la isquemia se deben al déficit de oxígeno, la isquemia y la hipoxia tienen efectos diferentes sobre el miocardio.

La oclusión coronaria, además de disminuir el aporte de oxígeno y sustratos metabólicos a las células miocárdicas, provoca un déficit en el drenaje venoso y linfático de los metabolitos tóxicos que se acumulan en el espacio extracelular del área isquémica. La reducción de oxígeno detiene la producción aeróbica de fosfatos de alta energía, utilizándose en su defecto las vías anaerobias. En el corazón isquémico aumenta progresivamente la concentración de hidrogeniones y ácido láctico y cae el pH intracelular conforme se acumulan éstos y otros metabolitos ácidos de la glicolisis; esta caída del pH tiene efecto inotrópico negativo directo. El lactato, además, inhibe la glicolisis en un momento en el que las células miocárdicas todavía contienen cantidades significativas de

glucógeno. El potasio acumulado en el espacio intercelular, por su parte, contribuirá a la generación de arritmias.

Por el contrario, en el corazón hipóxico, el lavado de todos estos metabolitos retrasa el desarrollo de acidosis intracelular y la generación de arritmias, y además continúa metabolizando tanto las reservas de glucógeno como la glucosa que pudiera llegar a través del flujo coronario. Por todo ello es comprensible que los efectos de la hipoxia sean menos lesivos que los producidos por la isquemia.

I.3.1.2.- ALTERACIONES METABOLICAS E IONICAS.

a) Fosfatos de alta energía.

Durante los primeros minutos de una isquemia severa la tensión tisular de oxígeno cae rápidamente de forma que impide que continúe la fosforilación oxidativa, iniciando el metabolismo anaerobio, con lo que la producción de fosfatos de alta energía -ATP y fosfato de creatina (FC)- disminuye marcadamente.

Considerando tan solo el rendimiento energético obtenido de la glucosa quedan claras las diferencias: de los 36 moles de ATP/mol de glucosa que se obtiene de la glicólisis aeróbica seguida de fosforilación oxidativa, la glicólisis anaerobia tan solo consigue obtener 2 moles de

ATP/mol de glucosa. Además hay que recordar que el principal aporte energético durante el metabolismo aeróbico normal en el miocito cardíaco lo constituyen los lípidos. Por ello, el mecanismo compensador de la glicólisis anaerobia resulta claramente insuficiente para mantener las reservas de fosfatos de alta energía necesarias para mantener la contracción miocárdica. La producción de lactato e hidrogeniones asociada al metabolismo anaerobio determinará la aparición de acidosis intracelular, lo cual terminará por inhibir pasos enzimáticos claves en la glicólisis anaerobia, con lo que este fenómeno compensador no sólo resultará insuficiente, sino que tendrá un carácter transitorio.

Los niveles de FC disminuyen antes y más rápidamente que los de ATP, ya que se encuentra en equilibrio con éste, y en presencia de ADP se hidroliza a creatina + ATP. En ausencia de fosforilación oxidativa, el ADP pasa a AMP, y a continuación se transforma en adenosina, inosina, hipoxantina y, finalmente en xantina (Jennings *et al*, 1981). Cuando el contenido de ATP desciende por debajo del 20% de su valor normal, los miocitos son incapaces de mantener los gradientes iónicos fisiológicos y de controlar su volumen. En lesiones isquémicas reversibles (susceptibles de mantener su viabilidad si se reperfundan) se suelen encontrar niveles de ATP por encima del 60%, mientras que niveles inferiores al 30% se suelen asociar a daño celular irreversible.

El metabolismo anerobio durante la isquemia se ve estimulado por mecanismos humores y bioquímicos. La descarga simpática asociada al

dolor isquémico y al fallo de bomba en caso de infarto masivo, aumenta los niveles de AMPc, el cual estimula a su vez la glicolisis y la glucogenolisis. Por otra parte, la caída en los niveles de ATP y glucosa-6-fosfato, hace desaparecer sus efectos inhibitorios sobre la glico- y glucógenolisis.

b) Hidrogeniones.

La mayor fuente de protones en el corazón isquémico deriva de la hidrólisis de fosfatos de alta energía, que dan lugar a grandes cantidades de fosfato inorgánico, ácido débil que libera hidrogeniones. Otra fuente importante es la glicolisis, con el ácido láctico como resultado final (Cobbe y Poole-Wilson, 1980).

La acidosis tiene dos efectos fundamentales sobre el corazón isquémico: inhibe la glicolisis actuando sobre diversas reacciones enzimáticas sensibles a la acidosis, e interfiere en el acoplamiento excitación-contracción desplazando al calcio de sus lugares en las proteínas contráctiles y uniéndose a la troponina I. De esta actuación se deduce el conocido efecto inotrópico negativo que causa la acidosis (Jacobus *et al*, 1982).

c) Fosfato inorgánico.

La hidrólisis de ATP y FC genera grandes cantidades de fosfato inorgánico, que actúa reduciendo la sensibilidad al calcio por parte de las proteínas contráctiles, como se describe en el apartado anterior.

d) Potasio.

A los pocos segundos de una oclusión coronaria empieza a salir potasio de las células miocárdicas. Esta pérdida es tan rápida y precoz que no puede achacarse a inhibición de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa. Probablemente se deba a que acompañe la salida de moléculas aniónicas como el lactato o el fosfato inorgánico.

El acúmulo de potasio en el espacio extracelular depolariza la célula y deprime la velocidad de conducción del potencial de acción a través de las membranas, facilitando la aparición de arritmias. Además, esta depresión excitatoria se asocia a un grado variable de disfunción mecánica.

e) Ácidos grasos y derivados.

En condiciones aeróbicas normales, del 60 al 90 % de los requerimientos de energía miocárdica provienen de la oxidación de los

ácidos grasos libres, presentes en las células miocárdicas en forma de ésteres grasos conteniendo coenzima A (Camici *et al*, 1991).

Durante la isquemia, el bajo aporte de oxígeno inhibe la beta-oxidación. Si la isquemia se prolonga se inhibe además la actividad de la acil-carnitina transferasa de cadena larga, responsable del transporte del Acil-CoA citosólico a la mitocondria antes de la oxidación. De esta forma aumentan los niveles de Acil-CoA mientras disminuyen los de acetil-CoA. El Acil-CoA acompañado de la excesiva producción de glicerol durante la isquemia, dará lugar a la síntesis de triglicéridos, que se acumularán en el miocardio isquémico. Existen datos contradictorios sobre el posible efecto deletéreo sobre las membranas celulares de estas moléculas anfipáticas (van der Vusse *et al*, 1985; Vyska *et al*, 1988).

f) Radicales libres.

Son moléculas extremadamente reactivas, puesto que poseen un electrón no apareado. Incluyen el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($-OH^\cdot$) y el peróxido de hidrógeno, que aunque no es en sí mismo un radical libre, da lugar a compuestos altamente reactivos.

Los radicales libres se originan en la cadena respiratoria, en el metabolismo final del ATP, en el del ácido araquidónico, catecolaminas y fosfolípidos de membrana. La isquemia severa puede aumentar los

niveles de radicales libres por diversos mecanismos: (a) disociación de la lanzadera electrónica a nivel mitocondrial, (b) la entrada de calcio inducida por la isquemia activa fosfolipasas que degradan ácido araquidónico y fosfolípidos de membrana, liberando a su vez radicales libres; (c) la isquemia transforma en algunas especies la actividad de la enzima xantino dehidrogenasa en xantino oxidasa, la cual en presencia de xantina libera radicales libres; (d) en el tejido isquémico se activa el complemento, que genera acumulación de neutrófilos y liberación de radicales libres.

Parece demostrada la toxicidad directa sobre las membranas celulares de estos radicales libres, que actuarían dando lugar a reacciones de peroxidación. En algunos modelos experimentales en animales se ha comprobado que atrapadores ("scavengers") tales como la superóxidodismutasa (Engler y Gilpin, 1989; Naslund *et al*, 1990) o la catalasa y otros inhibidores de su producción, como la deferoxamina (Willians *et al*, 1991), pueden disminuir el daño celular generado por la isquemia. Sin embargo, el papel de estos radicales en la patogenia del daño celular generado por la isquemia sigue siendo controvertido.

g) Proteínas.

Se producen cambios tanto en la síntesis como en su degradación. La síntesis está disminuida por inhibición de la iniciación y elongación de

la cadena peptídica. La elevación de los niveles del aminoácido alanina refleja tanto la disminución de la síntesis proteica como el aumento de la producción de piruvato por transaminación.

La degradación proteica requiere energía derivada del metabolismo oxidativo, y parece disminuir hasta un 80% en modelos experimentales de corazón aislado sometidos a isquemia severa. La proteólisis realizada por hidrolasas lisosomales se ha relacionado con los mecanismos de daño celular durante la isquemia, pero esta actividad enzimática no se encuentra elevada hasta varias horas después de iniciarse la isquemia (Schwalb *et al*, 1989).

h) Calcio.

Un aspecto crucial en la patogénesis del daño isquémico es el aumento de la concentración de calcio citosólico que tiene lugar desde los primeros minutos de la isquemia (Steenbergen *et al*, 1987; Lee y Allen, 1992).

Existen diversos métodos para determinar la concentración de calcio intracitosólico durante la isquemia: resonancia nuclear magnética (Steenbergen *et al*, 1990), radioisótopos, microelectrodos selectivos, marcadores fluorescentes como el indo 1 (Lee *et al*, 1988) y el fura-2 (Backx *et al*, 1995), o el método de la aequorina, una fotoproteína que

emite luz en presencia de Ca^{2+} (Allen *et al*, 1989), entre otros.

Lee y Allen (1991) analizaron críticamente los resultados obtenidos empleando los diversos métodos en distintos modelos experimentales de isquemia y proponen la siguiente cronología de modificaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$: incremento lento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sistólica y diastólica, alcanzando la primera el máximo tras 10 minutos de isquemia. Tras este período, el progresivo acortamiento del potencial de acción causa una caída en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y una eventual abolición del tránsito de Ca^{2+} , mientras que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en diástole seguiría aumentando.

Estos datos estarían en concordancia con los hallazgos electrofisiológicos, que indican la aparición de un desacoplamiento eléctrico a nivel celular con una cronología semejante y probablemente debido al aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Cascio *et al*, 1990). Por su parte, el tardío y gradual aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante la diástole parece más en relación con el fallo de los mecanismos de secuestro y salida del Ca^{2+} asociado a la severa caída en los niveles de ATP, que tarda varios minutos en ocurrir (Marban *et al*, 1990).

Diversos mecanismos contribuyen a producir esta sobrecarga de calcio intracitosólico: la disminución de los niveles de ATP puede bloquear el transporte de calcio a través de las Ca^{2+} -ATPasas de membrana y del RS. Por otra parte, la disminución de los niveles de ATP durante la isquemia miocárdica afecta directamente al funcionamiento de

la $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$ de membrana, aumentando de esta forma los niveles intracelulares de Na^+ . Este sodio será extruido a través del intercambiador $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ actuando en forma reversa, con lo que resultará un aumento del calcio intracitosólico. Además, este aumento inicial de los niveles de calcio citosólico puede disparar la apertura de los canales de salida de Ca^{2+} del RS (Meissner, 1994), elevando aún más la concentración de calcio intracitosólico.

El contenido global de calcio celular no parece variar significativamente hasta el momento mismo de la reperfusión (Bourdillon y Poole-Wilson, 1981; Poole-Wilson *et al*, 1984). Por ello, puede afirmarse que la inversión del intercambiador $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ es un fenómeno tardío, asumiendo que, al menos durante la fase precoz de la isquemia, la sobrecarga de calcio intracitosólico es expresión de la redistribución del calcio intracelular, en especial, de la salida de calcio del RS (Zucchi *et al*, 1995).

Este exceso de calcio será amortiguado en parte por un acúmulo de calcio intramitocondrial, lo cual trae consigo una mayor disminución en la producción de ATP a este nivel. La activación de las $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPasas}$ ante la sobrecarga de calcio terminará por agotar los niveles de ATP. Además el aumento de Ca^{2+} también activa fosfolipasas con las consecuencias descritas en apartados anteriores.

La isquemia miocárdica también se relaciona con una pérdida en

la capacidad de ligar calcio por parte del sarcolema. En miocardio de conejo y perro sometidos a diferentes períodos de isquemia (15 a 75 minutos) se ha determinado por métodos citoquímicos una pérdida del calcio sarcolémico (Vandeplasseche y Borgers, 1990). El calcio parece unirse a fosfolípidos de membrana con cabezas con cargas negativas (fosfatidilserina, fosfatidilinositol o fosfatidiletanolamina). Esta familia de fosfolípidos se encuentra exclusiva, o predominantemente al menos, en la hoja interna de la bicapa lipídica. Esta asimetría en la distribución de los fosfolípidos se pierde tras la isquemia (Musters *et al*, 1993) y la inhibición metabólica (Post *et al*, 1993).

I.3.1.3.- ALTERACIONES ELECTROFISIOLOGICAS.

Las alteraciones metabólicas comentadas y, en especial, los desequilibrios iónicos generados por la isquemia: aumento del Na^+ y Ca^{2+} intracelular, aumento del K^+ extracelular, acidosis intracelular, provocan una disminución del potencial de reposo y de la velocidad de la fase de ascenso rápido del potencial de acción, así como una disminución de la amplitud y duración del mismo, con acortamiento del período refractario. A todo esto hay que añadir la liberación in vivo de catecolaminas, con su conocido efecto proarrítmico.

Si estas alteraciones progresan, se produce una disminución de la excitabilidad celular y una depresión de la propagación del estímulo

dentro del área isquémica, con el consiguiente bloqueo. Al progresar la isquemia, las células evolucionan hacia la inexcitabilidad.

En este contexto se comprende la frecuencia de aparición de arritmias, sobre todo ventriculares, en la fase aguda de la isquemia severa. Pueden aparecer por un aumento del automatismo propio o por actividad repetitiva (pospotenciales), por corrientes de lesión y por reentrada, si bien los dos primeros mecanismos no han sido confirmados en modelos experimentales con corazón entero (Cinca, 1988).

I.3.1.4.- ALTERACIONES DE LA EXPRESION GENICA.

En las células miocárdicas la isquemia produce alteraciones específicas en las concentraciones basales de RNAm que codifica proteínas con funciones dispares en las células miocárdicas. Estas observaciones indican que las consecuencias a largo plazo de la isquemia, pueden ser reflejo de una expresión genética alterada que determina la existencia de concentraciones anormales de proteínas intracelulares específicas (Currie *et al*, 1988).

El impacto potencial de la expresión genética alterada de la síntesis de proteínas específicas a la hora de generar disfunción cardíaca queda expresado en la relación existente, por ejemplo, entre el enlentecimiento de la relajación y la disminución de la expresión de los genes de la Ca^{2+} -

ATPasa, con la consiguiente disminución de la concentración de bombas de calcio intracelulares en los corazones de rata hipertróficos (de la Bastie *et al*, 1990).

I.3.1.5.- ALTERACIONES FUNCIONALES.

La interrupción del flujo coronario en una parte del corazón de mamífero se sigue, casi inmediatamente, de una disminución de la contractilidad. En realidad, la alteración más precoz se produce en la función diastólica o lusitrópica, con una disminución de la relajación y distensibilidad muscular.

Se consideran al menos tres causas como responsables del rápido desarrollo de las anomalías lusitrópicas e inotrópicas en el corazón isquémico:

- *Pérdida del efecto "Manguera de jardín"*: La distensión que genera la presión de perfusión coronaria sobre los sarcómeros adyacentes mejora la función contráctil de los mismos en función de la ley de Starling (Vogel *et al*, 1982). Este efecto se pierde al producirse la oclusión coronaria. De esta forma, la caída de la presión de perfusión coronaria produce un inmediato efecto inotrópico negativo.

- *Deprivación de sustratos, fundamentalmente oxígeno* : En el primer minuto de oclusión coronaria la tensión tisular de oxígeno cae a

valores extremadamente bajos. El corazón no almacena oxígeno, mientras que otros sustratos como el glucógeno pueden durar bastante tiempo después de iniciarse la isquemia gracias a las considerables reservas miocárdicas.

- *Acumulación de metabolitos* : Como se describió antes, el acúmulo intracelular de fosfato e hidrogeniones, principalmente, y el aumento de los niveles extracelulares de potasio, acaban produciendo depresión de la contractilidad.

En modelos experimentales se comprueba que la fase más precoz de la respuesta inotrópica negativa corresponde al efecto mecánico de la pérdida de perfusión coronaria (efecto "manguera de jardín"). A continuación, la caída de los niveles de ATP, acidosis y aumento de fosfato inorgánico desensibilizan la troponina C frente al calcio, con lo que se requieren mayores niveles de calcio intracitosólico para conseguir el mismo grado de activación.

El efecto lusitrópico negativo es el primer cambio funcional observado tras la oclusión coronaria. No existe todavía una explicación para este hecho, ya que la caída de los niveles de ATP, que retrasaría la recaptación del Ca^{2+} citosólico por el RS, no ocurre de forma tan precoz como para afectar desde un primer instante a la diástole.

La disfunción ventricular isquémica, tanto sistólica como diastólica,

pone en marcha una serie de mecanismos hemodinámicos y neurohormonales, que intentan restablecer la normalidad, evitando así la aparición de insuficiencia cardíaca (Packer, 1992).

En primer lugar aparece un aumento de la presión y volumen diastólicos. Este aumento de la precarga provoca un aumento de la contracción por el mecanismo de Frank-Starling. Por otro lado, la disminución del volumen sistólico activa el sistema simpático, determinando un aumento tanto de la fuerza como de la frecuencia de la contracción. Sin embargo, tanto la dilatación ventricular como la activación simpática acaban provocando aumento de la tensión parietal y, por tanto, del consumo de oxígeno miocárdico, con el riesgo que ello supone en el contexto de la isquemia.

I.3.1.6.- ALTERACIONES ESTRUCTURALES.

Las lesiones que conducen a muerte celular (necrosis) se inician en modelos experimentales tras 15-40 minutos de isquemia total. Tras 6 horas, quedan muy pocas células viables.

La necrosis se inicia en el endocardio, donde los requerimientos energéticos son mayores, y avanza hacia el epicardio (infarto transmural). La descripción de lesiones en fases precoces de isquemia (< 15 minutos), y durante el período de transición (entre los 15 y 40 minutos) resulta

especialmente compleja, sobretodo si se pretende extraer información de criterios de daño celular reversible o irreversible (punto sin retorno).

En este apartado sólo se mencionarán los mecanismos de daño celular que aparecen como consecuencia de la fase de isquemia, dejando para el apartado de reperfusión los asociados a la misma.

Las regiones isquémicas toman un aspecto pálido, de infarto acelular, al que en ocasiones se ha denominado "momificación". Puesto que los leucocitos no pueden acceder al tejido necrótico en un área no perfundida, las células miocárdicas sufren autólisis quedando con este aspecto macroscópico.

Uno de los puntos más oscuros es el relativo a los mecanismos de lesión y muerte celular. La mayoría de los estudios se centran en el posible daño producido sobre membranas por diversos metabolitos.

Existe acuerdo generalizado en que durante la isquemia severa y prolongada la membrana plasmática pierde su función de barrera que mantiene un medio intracelular adecuado. Los posibles mecanismos propuestos ya han sido comentados e incluyen:

- Ataque de fosfolipasas y proteasas.**
- Radicales libres.**
- Efecto detergente de ácidos grasos libres.**

- Sobrecarga osmótica intracitosólica, consecuencia del acúmulo de metabolitos.
- Lesión del citoesqueleto.
- Sobrecarga de calcio.

En los primeros 15 minutos de isquemia miocárdica se producen una serie de cambios estructurales, en general reversibles. Consisten en un edema moderado que afecta al sarcolema y todas las organelas. Además existe una disminución de los depósitos de glucógeno, relajación de las miofibrillas y un leve desplazamiento de la cromatina celular (Fukuhara, 1985).

Cuando existen períodos de isquemia prolongados los fenómenos iniciales descritos se exageran. El desarrollo de densidades amorfas en la matriz mitocondrial (depósitos de fosfato cálcico) y la apreciación de hendiduras en el plasmalema (Jennings y Hawkins, 1980) se consideran signos de daño miocárdico irreversible.

I.3.2.- MIOCARDIO "HIBERNADO" Y "CONTUNDIDO".

El término miocardio aturdido o contundido ("stunning") describe la disfunción contráctil provocada por una oclusión coronaria de unos minutos de duración, y que persiste durante horas, e incluso días después de la reperfusión (Braunwald y Kloner, 1982). Incluye, por tanto, dos

aspectos fundamentales: disfunción contráctil reversible y prolongada con un flujo coronario normal o casi normal. Por el contrario, el miocardio hibernado expresa una insuficiencia contráctil también reversible, pero en el contexto de una hipoperfusión severa crónica (Rahimtoola, 1989).

Los mecanismos responsables de estos estados no se conocen bien. Se ha postulado que la deplección de nucleótidos de adenina tras la fase isquémica podría justificar estos cuadros, ya que su síntesis de novo es lenta y puede llevar varios días. Por otra parte, los posibles cambios en la expresión génica de ciertas proteínas tras la isquemia podría explicar, al menos en parte, estos períodos de disfunción más o menos prolongados tras la reperfusión.

Se ha relacionado el "stunning" con el retraso en la síntesis de novo de ATP, consecuencia a su vez de la pérdida del sustrato adenosina durante el período isquémico, sin embargo, también hay trabajos que demuestran una adecuada recuperación funcional a pesar de presentar bajos niveles de ATP (Taegtmeyer *et al*, 1985).

El papel del calcio en la patogenia del "stunning" también resulta contradictorio. Este podría ser consecuencia de una disminución de la disponibilidad de calcio intracelular, de un déficit en la captación de calcio por parte del RS o de una alteración de las proteínas contráctiles incapaces de responder ante una concentración normal de calcio citosólico (Opie, 1989). Este último efecto, posiblemente como resultado de la

fosforilación o modificación covalente de las proteínas contráctiles provocada por proteasas y protein-quinasas activadas por el calcio intracelular. Kusuoka *et al* (1987), por su parte, achaca este fenómeno a una sobrecarga precoz de calcio, durante la fase de reperfusión, que podría generar daños en las membranas intracelulares, alterando así, al menos transitoriamente, la homeostasia del calcio.

Se ha demostrado una elevación en los niveles de inositol 1,4,5-trifosfato durante la fase inicial de la reperfusión en corazón de rata aislado. Este es un segundo mensajero que estimula la salida de Ca^{2+} del RS miocárdico, con lo que podría contribuir a la sobrecarga de Ca^{2+} en esta fase y con ello a la disfunción miocárdica postisquémica (Mouton *et al*, 1991).

Opie y du Toit (1992) proponen un mecanismo patogénico bifásico en el que el calcio es el protagonista. La primera fase ocurriría muy rápidamente, de forma inmediata tras la reperfusión, asociada a una sobrecarga de calcio intracitosólico y coincidiendo con una función mecánica normal. Si en este punto se administran fármacos inhibidores de la entrada de calcio, disminuirán posteriormente la extensión del "stunning". En la segunda fase (stunning establecido) ya hay hipocontractilidad y los antagonistas del calcio administrados en este momento podrían empeorar aún más la función miocárdica.

El papel de los radicales libres en este fenómeno parece demostrado

por multitud de trabajos que demuestran mejorías añadiendo inhibidores de la formación de radicales libres y/o atrapadores ("scavengers") como desferrioxamina, N-acetilcisteína, allopurinol, superóxidodismutasa o mercaptopropionil glicina antes de la isquemia o en el instante del comienzo de la reperusión. Uno de los efectos de los radicales libres consiste en contribuir a la sobrecarga de calcio alterando la captación del mismo por el RS (Rowe *et al*, 1983).

Existen canales de potasio sensibles a ATP que se activan como resultado de una disminución en los niveles intracelulares de ATP y un acortamiento de la duración del potencial de acción; elevaciones del ADP y de la concentración intracelular de protones producen el mismo efecto (Noma, 1983; Shigematsu *et al*, 1995). Estas alteraciones en el medio intracelular tienen lugar durante la isquemia, y de hecho estos canales permanecen activados durante la misma, y una fracción de ellos sigue activada durante la fase inicial de la reperusión. Cole *et al* (1991) han demostrado que la activación de estos canales juega un papel importante en la preservación de la función celular durante la isquemia: el bloqueo de los canales con glibenclamida empeoraba la recuperación de la contractilidad mientras que su apertura con pinacidil la mejoraba. Hoy día existen evidencias farmacológicas de diverso tipo a favor de que la activación persistente de estos canales de K sensibles a ATP durante la fase precoz de la reperusión puede proteger de manera eficaz frente al "stunning" miocárdico (Shigematsu *et al*, 1995).

I.3.3.- PRECONDICIONAMIENTO ISQUEMICO.

El tejido miocárdico expuesto a un estrés ligero, subletal, es capaz de desarrollar una serie de cambios adaptativos que le permiten una mejor tolerancia ante una nueva exposición a un estrés (de la misma naturaleza o no) más intenso e incluso potencialmente letal (Reimer *et al*, 1994).

En el contexto de la isquemia, Murry *et al* (1986) demostraron que el corazón de perro, "precondicionado" con breves períodos de isquemia de 5 minutos de duración, seguidos de períodos de reperusión de otros 5 minutos cada uno, toleraba a continuación una isquemia prolongada de 40 minutos de duración resultando un área de necrosis de tan solo el 25% respecto al grupo control.

El preconditionamiento isquémico es un potente factor de protección frente a la isquemia prolongada, y su eficacia ha sido demostrada en repetidas ocasiones, reproduciéndose también en cerdos (Schott *et al*, 1990), conejos (Thornton *et al*, 1990) y ratas (Yellon *et al*, 1992).

El mecanismo o mecanismos involucrados en este fenómeno no están claros. Un hecho clave es la reducción de la demanda energética por parte del miocardio isquémico, puesta de manifiesto por una reducción en los índices de utilización de fosfatos de alta energía

(Jennings *et al*, 1991a). Este enlentecimiento en la deplección de ATP durante la isquemia en miocardios preconditionados no se debe a una inhibición precoz de la ATPasa mitocondrial (Jennings *et al*, 1991b), sino que parece ser una característica que acompaña a la disfunción contráctil postisquémica ("stunning") que tiene lugar tras períodos de isquemia de corta duración, si bien este punto resulta controvertido (Miura *et al*, 1991; Matsuda *et al*, 1993).

Otros mecanismos propuestos incluyen efectos mediados por catecolaminas (Schomig, 1990), activación de receptores de adenosina (Liu *et al*, 1991), apertura precoz de canales de potasio ATP-sensibles (Gross y Auchampach, 1992) y proteínas G (Thornton y Downey, 1991).

Recientemente se han puesto de manifiesto evidencias que relacionan la fisiopatología del preconditionamiento isquémico con el control de la homeostasia del calcio. Steenbergen *et al* (1993) descubrieron que la sobrecarga de calcio citosólico está retrasada en el miocardio preconditionado. Por otra parte, Zucchi *et al* (1994), observaron en corazones de rata que la densidad de canales de salida de calcio del RS descendía tras breves períodos de isquemia. Estos hallazgos son interpretados de la siguiente manera: el preconditionamiento determina la deplección de glucógeno, lo cual retrasa el desarrollo de acidosis intracelular, de sobrecarga de Na^+ (a través del intercambiador $\text{Na}^+ - \text{H}^+$) y de entrada de calcio a través del intercambiador $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$. La sobrecarga de calcio citosólico es expresión de una redistribución del

calcio intracelular. Zucchi *et al* (1995) postulan que la sobrecarga se iniciaría por inhibición de la Ca^{2+} -ATPasa del RS al disminuir los niveles de ATP, por otra parte, la liberación de calcio del RS una vez que empieza a elevarse el Ca^{2+} intracitosólico, se vería enlentecida al disminuir el número de canales de salida de Ca^{2+} del RS con el preconditionamiento. Este retraso en la sobrecarga de Ca^{2+} durante la isquemia al disminuir, por un mecanismo todavía ignorado, el número de canales de salida de Ca^{2+} del RS durante el preconditionamiento, podría constituir la base molecular del preconditionamiento isquémico.

I.3.4.- FISIOPATOLOGIA DE LA REPERFUSION MIOCARDICA.

I.3.4.1.- FENOMENOS RESPONSABLES DEL DAÑO INDUCIDO POR LA REPERFUSION.

Si bien la duración de un episodio de isquemia es fundamental para predecir la evolución del tejido miocárdico afectado, de forma que cuanto antes se produzca la reperfusión más miocardio podrá salvarse, este fenómeno de reperfusión lleva asociado una serie de efectos adversos ("daño inducido por reperfusión") que limitan en parte sus efectos beneficiosos (Braunwald y Kloner, 1985):

- *Aceleración de la necrosis celular:* tras la reperfusión las células

isquémicas sufren en ocasiones una serie de cambios estructurales que acaban conduciendo a la muerte celular. Estos cambios se observan muy rápidamente, e incluyen hinchazón y alteraciones de la arquitectura celular. Esta en duda si este fenómeno tiene lugar tan solo sobre aquellas células que presentan ya un daño irreversible, de manera que no afectaría significativamente a la evolución del tejido miocárdico implicado.

- *Aparición de edema intracelular*: ya hemos mencionado que es uno de los fenómenos más comúnmente observados. Este edema puede causar compresión de capilares miocárdicos produciendo nuevas zonas de isquemia o no perfusión de territorios ya afectados (Jennings *et al*, 1985).

- *Fenómeno de "no-reperfusión"*: la isquemia también produce daño al endotelio capilar. La alteración de la microvasculatura tras períodos de isquemia prolongados puede impedir que ciertas zonas se reperfundan de hecho. Sin embargo, este fenómeno suele quedar englobado en zonas con daño isquémico irreversible, por lo cual no suele aumentar el daño celular ni afectar a la evolución de ese miocardio (Kloner *et al*, 1974).

- *Hemorragia inducida por la reperfusión*: la afectación de capilares ya descrita puede explicar igualmente la aparición de zonas de infarto hemorrágico tras la reperfusión.

- ***Sobrecarga de calcio:*** acaba produciendo contractura y muerte celular. Al igual que ocurre con la sobrecarga de calcio durante la isquemia, no se sabe si la entrada de calcio es la causa de la muerte celular, o si tan solo es expresión de lesión irreversible de la membrana plasmática.

Los fármacos inhibidores de los canales lentos del calcio son incapaces de inhibir por acción directa el paso de este catión al interior celular y, por tanto, no parece que puedan jugar ningún papel protector actuando exclusivamente sobre las células miocárdicas "in vitro" (Bourdillon y Poole-Wilson, 1982). En modelos "in vivo" su efecto protector parece más relacionado con la disminución del consumo de oxígeno miocárdico.

- ***Paradoja del oxígeno:*** el mecanismo de explicación de este fenómeno es semejante al de la paradoja del calcio (Hearse *et al*, 1978). Su efecto nocivo podría estar mediado por la entrada, formación o liberación de radicales libres.

Este fenómeno se estudió en corazones aislados perfundidos con soluciones tamponadas anóxicas, y después reoxigenados. La reoxigenación provocaba edema celular explosivo, necrosis en bandas de contracción y liberación masiva de enzimas (Hearse, 1973).

Un hallazgo común en las células miocárdicas reoxigenadas tras un

período prolongado de deplección de energía es la aparición de una rápida hipercontractura junto a la citolisis. Se ha postulado que esta hipercontractura está provocada por el nuevo suministro de energía (proveniente de la fosforilación oxidativa) hacia las miofibrillas, las cuales podrían presentar un estado potencial de alta activación al encontrarse en un medio con una alta concentración de calcio (como consecuencia de la deplección de energía durante la fase hipóxica) al inicio de la reoxigenación (Siegmund *et al*, 1993). De este modo, la severa sobrecarga de calcio citosólico y la reactivación de la producción de energía serían los factores clave para interpretar esta hipercontractura deletérea.

Para comprobar si la hipercontractura es efectivamente un evento primordial en la patogénesis de la paradoja del oxígeno se han desarrollado experimentos que intentan prevenirla bloqueando el aparato contráctil en las fases iniciales de la reperusión. La 2,3-butanodiona monoxima provoca parálisis contráctil actuando a nivel de las miofibrillas, posiblemente imitando el efecto inhibitorio de la troponina I (Gwathmey *et al*, 1991). Pese a presentar efectos adversos sobre otras funciones celulares, se la considera una herramienta útil para provocar un bloqueo contráctil reversible en células musculares, ya que el inicio de acción es muy rápido y la reversión de la misma tiene lugar en menos de 1 minuto. Experimentos realizados *in vitro* (Gwathmey *et al*, 1991) e *in vivo* (García-Dorado *et al*, 1992) en cerdos han demostrado una evidente cardioprotección con la inhibición del aparato contráctil en la fase inicial de la reoxigenación, con lo que el efecto patológico de la

hipercontractura en la paradoja del oxígeno y en el daño asociado a la perfusión parecen demostrados.

En cualquier caso, las consecuencias de la perfusión sobre el miocardio isquémico dependen fundamentalmente del grado de afectación de los miocitos y de la microvasculatura adyacente.

I.3.4.2.- REPERFUSION DE MIOCITOS CON DAÑO REVERSIBLE.

Períodos de isquemia severa inferiores a 15 minutos suelen producir lesiones celulares reversibles: tras perfusión no derivan en necrosis (Jennings *et al*, 1960). Sin embargo, una recuperación completa funcional y metabólica puede requerir varios días, incluso tras períodos de isquemia de tan solo 5 minutos (Kloner *et al*, 1983).

Las alteraciones ultraestructurales ya descritas anteriormente se recuperan rápidamente tras la perfusión. Tras 20 minutos de perfusión no se aprecia ninguno de los signos de lesión precoz: pérdida de glucógeno, relajación de miofibrillas, ligero desplazamiento marginal de la cromatina celular, ligero edema celular y alteraciones mitocondriales. Tan solo un cierto grado de edema mitocondrial puede

persistir ocasionalmente durante varios días (Jennings *et al*, 1985).

Si bien la fosforilación oxidativa se recupera rápidamente tras la reperfusión, los niveles de ATP pueden tardar hasta 4 días en regresar a valores normales (Kloner *et al*, 1983).

Por otro lado, la recuperación funcional suele ser lenta, y requerir varios días: es el conocido "miocardio aturdido" o "contundido" (Braunwald y Kloner, 1982). Tras la reperfusión aumenta súbitamente la contractura miocárdica, haciéndose máxima en los primeros minutos y disminuyendo posteriormente hasta alcanzar un nivel de tensión de reposo similar al previo a la reperfusión, generalmente hacia los 30 minutos (Bourdillon y Poole-Wilson, 1981, 1982). La contractura guarda relación con la unión permanente del calcio a la troponina C. Ello se produce tanto por falta de recaptación por parte del retículo sarcoplásmico como por aumento del calcio intracitosólico (Nayler, 1981).

I.3.4.3.- REPERFUSION DE MIOCITOS CON DAÑO IRREVERSIBLE.

Períodos de isquemia severa superiores a 30-40 minutos suelen producir un daño celular irreversible. La reperfusión en estos casos suele acelerar el proceso de destrucción celular. Por microscopía electrónica se

demuestra la aparición de edema celular intenso y explosivo, con formación de amplias vesículas bajo el sarcolema, todo ello relacionado con aumento de la osmolaridad intracelular (Jennings y Reimer, 1983). Las alteraciones a nivel de sarcómeros son evidentes, con fenómenos de disrupción y contractura.

La alteración iónica más evidente es el masivo incremento en la concentración de calcio intracitosólico, con depósitos de fosfato cálcico en la matriz mitocondrial (Jennings *et al*, 1965). Este influjo masivo de calcio parece estar más relacionado con la alteración estructural de la membrana que con posibles alteraciones del transporte de calcio, sobre todo a nivel del intercambiador $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$.

La necrosis en bandas de contracción, puede observarse ya en los dos primeros minutos de la reperfusión. Esta forma de necrosis miocárdica, signo evidente de daño celular irreversible (Ganote, 1983), puede encontrarse también en procesos no isquémicos: cardiotoxicidad por catecolaminas, shock eléctrico, accidentes cerebrovasculares, miocarditis, hipopotasemia, hipomagnesemia y en el contexto de la paradoja del oxígeno y de la paradoja del calcio. También se la denomina "degeneración miofibrilar".

I.3.4.4.- PAPEL DEL CALCIO EN EL DAÑO INDUCIDO POR LA REPERFUSION.

Se han propuesto múltiples mecanismos para explicar el fenómeno de lesión celular asociado a la reperfusión miocárdica: sobrecarga de calcio, radicales libres, desacoplamiento de la respiración mitocondrial y lesión mecánica del sarcolema.

Hoy día se acepta que la sobrecarga de calcio durante la reperfusión constituye uno de los aspectos claves en el daño postreperfusión (Marban *et al*, 1989; Opie, 1989).

La sobrecarga de calcio durante la reperfusión es tanto más intensa cuanto más prolongada y severa sea la isquemia. Además, tras períodos de isquemia prolongados no se recupera la homeostasis del calcio intracitosólico, a diferencia de lo que ocurre en el miocardio contundido (Marban *et al*, 1994).

Los mecanismos exactos responsables de esta alteración de la homeostasia del calcio no están claros. Se postulan cuatro factores interrelacionados: depleción de ATP, desbalance osmótico, trauma mecánico y actividad del intercambiador $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$.

Tras la reperfusión, el restablecimiento parcial del metabolismo energético y el lavado de sustancias inhibitorias como el fosfato

inorgánico y los hidrogeniones, en el contexto de un citosol ya sobrecargado de calcio durante la isquemia, hacen que pueda restablecerse la actividad ATPasa a nivel de las proteínas contractiles. El resultado es una contractura masiva que puede traumatizar las células irreversiblemente (Nayler, 1983).

El lavado de metabolitos acumulados en el intersticio provoca una súbita alteración del equilibrio osmótico, que a su vez puede provocar más daño celular irreversible (Jennings *et al*, 1986).

Incluso en células que mantienen a pesar de todo la integridad de membranas, el influjo de calcio puede darse por la reactivación del intercambiador $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ en sentido reverso (Grinwald, 1984) y por la producción de radicales libres (Opie, 1989). Otros autores apuntan el posible papel de los canales de goteo de calcio o canales tipo B, descritos en miocitos ventriculares de rata (Coulombe *et al*, 1989), con la sobrecarga de calcio (Wang *et al*, 1995). En otros muchos casos, la entrada masiva de calcio parece ser consecuencia del daño de membrana.

De esta forma se acaba estableciendo un círculo vicioso, en el que la sobrecarga de calcio puede ejercer por sí misma una serie de efectos catastróficos que incluyen mayor alteración de la regulación del calcio y afectación de la síntesis de ATP.

La sobrecarga de calcio altera el proceso de producción de energía

en la mitocondria. De hecho, el acúmulo de gránulos densos en la mitocondria constituye un criterio fundamental de daño celular irreversible inducido por la isquemia y la reperfusión. Estos gránulos densos son depósitos de calcio y su grado de acumulación se correlaciona de forma negativa con la preservación de la función (Henry *et al*, 1977).

Miller y Tormey (1995), trabajando con músculos papilares de hurón sometidos a una hora de isquemia seguida de 5 minutos de reperfusión, midieron a continuación la concentración de calcio en distintos compartimentos subcelulares mediante microanálisis con sonda electrónica de los miocitos supervivientes. No encontraron cambios en la concentración de calcio total en estos miocitos, pero sí una llamativa redistribución del mismo entre los compartimentos subcelulares, con un aumento del calcio intramitocondrial durante la isquemia que volvía a valores basales durante la reperfusión y una caída del 90% en el calcio del "tercer compartimento"(RS + sarcolema + sarcoplasma libre) tras la reperfusión, a costa de un aumento del calcio en el compartimento miofibrilar, fundamentalmente.

Igualmente, medidas realizadas en músculo ventricular de conejo sometido a 60 minutos de isquemia y 5 minutos de reperfusión mostraron una pérdida del 50% del calcio contenido en el "tercer compartimento" que se redistribuía hacia mitocondria y miofibrillas (Walsh y Tormey, 1988 a y b). En ambos casos, la caída de Ca^{2+} en el tercer compartimento de estos miocitos viables, se achacaba a pérdida del Ca^{2+} almacenado en

el RS. Estos autores proponen el daño en el sarcolema y mitocondrias como factores críticos en el daño asociado a la reperfusión.

I.4.- INHIBIDORES DE LA Ca^{2+} -ATPasa DEL RETICULO SARCOPLASMICO.

I.4.1.- ACIDO CICLOPIAZONICO.

El ácido ciclopiazónico (CPA) es una micotoxina producida por diversas especies de hongos *Penicilium* y *Aspergillus*. Desde el punto de vista químico es un ácido indol tetrámico (Figura 7). Desde hace menos de una década se conoce su capacidad de inhibir específicamente la Ca^{2+} -ATPasa del RS de músculo esquelético de conejo (Seidler *et al*, 1989) y de rata (Goeger y Riley, 1989). También produce el mismo efecto sobre la bomba de Ca^{2+} del RS de músculo liso (Uyama *et al*, 1992). No tiene ningún efecto sobre ATPasas tipo F, como la H^{+} -ATPasa mitocondrial, ni sobre otras ATPasas tipo P, como la H^{+} - K^{+} -ATPasa gástrica, las Na^{+} - K^{+} -ATPasas renales y cerebrales y la Ca^{2+} -ATPasa eritrocitaria (Seidler *et al*, 1989).

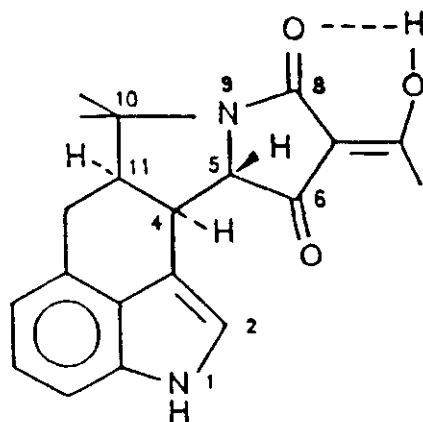


Figura 7.- Estructura molecular del ácido ciclopiazónico.

A nivel de miocardio, el CPA ha demostrado bloquear completamente la Ca^{2+} -ATPasa del RS en vesículas de RS (Lahouratate *et al*, 1992) y en miocitos aislados, disminuyendo en éstos la fuerza contráctil (Miller *et al*, 1990; Pery-Man *et al* 1993). Sobre músculo papilar de rata adulta, en rango de dosis de 0,3 a 30 μM , produce un efecto inotrópico negativo de instauración lenta (pudiendo tardar en equilibrarse hasta 60 minutos) acompañado de una prolongación extrema de la fase de relajación del ciclo contráctil (Takahashi *et al*, 1994). Sin embargo, en miocitos neonatales no se observó tal efecto (Agata *et al*, 1993), ya que en ellos la contracción miocárdica depende fundamentalmente del influjo trans-sarcolémico de Ca^{2+} más que del liberado por el RS (Bers *et al* 1981).

Baudet *et al* (1993), trabajando con trabéculas ventriculares de conejo bañadas con CPA 10^{-4} M encontraron una disminución de la contractilidad del 45% y un incremento del tiempo para el pico de tensión desarrollada así como una prolongación de la fase de relajación. Este mismo grupo encuentra, utilizando la técnica de contractura por enfriamiento rápido próximo a 0°C , que ni siquiera a altas dosis existe un bloqueo completo de la bomba de Ca^{2+} del RS, por lo que no se puede afirmar que, en preparaciones multicelulares, llegue a producir un bloqueo completo de la misma. Otras experiencias con cafeína y ryanodina apoyan esta afirmación.

El CPA no tiene ningún efecto sobre el intercambiador Na^{+} - Ca^{2+}

(Yard *et al*, 1994), aumenta la sensibilidad miofibrilar al Ca^{2+} en fibras cardíacas, y en corazón de rana no sólo no disminuye la amplitud contractil, sino que aumenta el pico de tensión (Badaoui *et al*, 1995).

I.4.2.- THAPSIGARGINA.

El segundo inhibidor de la bomba de Ca^{2+} del RS es la Thapsigargina, un promotor tumoral de naturaleza química (lactona sesquiterpénica de origen vegetal) diferente al CPA y que parece actuar por otros mecanismos (Sagara e Inesi, 1991). Su comportamiento es muy semejante al del CPA: (a) bloquea por completo la bomba de Ca^{2+} en vesículas de RS y en miocitos aislados sin afectar a otras bombas de Ca^{2+} (Kirby *et al*, 1992); (b) en preparaciones multicelulares disminuye la contractilidad en un rango semejante al CPA, (c) alarga el tiempo para pico y (d) no llega a alcanzar un bloqueo completo. Sin embargo, no alarga el período de relajación, quizás por efectos colaterales estimulando la salida de Ca^{2+} via intercambiador o disminuyendo la sensibilidad de los miofilamentos al Ca^{2+} , y podría producir un grado de bloqueo algo menor que el CPA y menos específico (Baudet *et al*, 1993). La thapsigargina podría bloquear el canal lento de entrada de calcio, pero este efecto sólo se aprecia a concentraciones de thapsigargina varios órdenes de magnitud por encima de los que bloquean la Ca^{2+} -ATPasa del RS (Buryi *et al*, 1995).

Du Toit y Opie (1994) demostraron cierto grado de protección frente al daño de reperfusión en corazones de ratas sometidos a 20 minutos de isquemia y 20 minutos de reperfusión y pretratados con CPA 10^{-7} M o Thapsigargina $2,5 \times 10^{-8}$ M. Sin embargo, con altas dosis de Thapsigargina (10^{-6} M), se empeoraba el grado de recuperación respecto al control, lo cual sugiere también un menor grado de especificidad. El CPA resultaba efectivo incluso cuando se aplicaba sólo durante la reperfusión.

En definitiva, la mayoría de los autores coinciden en señalar estos fármacos, y muy especialmente el CPA por su mayor especificidad, como agentes de elección para estudiar la participación del RS en los procesos de acoplamiento excitación-contracción y en el daño asociado con la reperfusión miocárdica.

II.- PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

La sobrecarga de Ca^{2+} durante la isquemia miocárdica y, más especialmente durante la reperfusión, constituye unos de los mecanismos más aceptados de daño celular (Marban *et al*, 1989). Los últimos estudios parecen establecer que el calcio acumulado en el RS podría ser el contribuidor principal a la sobrecarga de Ca^{2+} citosólico durante la isquemia-reperfusión (Miller y Tormey, 1995).

Recientemente ha sido publicado por primera vez que la inhibición de la Ca^{2+} -ATPasa del RS (SERCA) del corazón de rata *in vitro* disminuye el daño funcional inducido por la reperfusión en el miocardio contundido ("stunning") (du Toit y Opie, 1994). La contribución de la SERCA al proceso excitación-contracción varía en función de la especie animal (Wolska y Levartowski, 1993; Chiesi *et al*, 1994; Bassani *et al*, 1994) y del grado de desarrollo y situaciones patológicas intercurrentes (Lompre *et al*, 1994).

En la actualidad no existen estudios que demuestren la utilidad de estos fármacos sobre períodos de isquemia de larga duración (≥ 30 minutos), con evaluación no sólo de tipo funcional (incremento de tensión de reposo, porcentaje de recuperación de contractilidad sobre valores preisquémicos), sino también sobre integridad de membrana (liberación de enzimas intracelulares) y análisis objetivo (microscópico) sobre mantenimiento de estructuras morfológicas (intensidad de edema celular, bandas de contracción, ruptura de membranas...). Tampoco existen estudios que evalúen las posibles acciones antiisquémicas de los

inhibidores de la SERCA en otra especie animal diferente a la rata, y ésto sólo bajo condiciones de contusión miocárdica experimental. Por ello, es preciso confirmar que los efectos antiisquémicos también se mantienen en isquemia prolongada y en otras especies animales.

El objetivo global de esta tesis era valorar si el bloqueo de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA) del corazón de conejo produce cardioprotección sobre la isquemia miocárdica experimental. Para ello nos propusimos :

1.- Seleccionar el *rango de dosis útil* de un inhibidor de la SERCA, el ácido ciclopiazónico (CPA), en base al rango que produce efectos lusitrópicos negativos.

2.- Valorar el efecto del CPA sobre *parámetros funcionales* en condiciones basales, durante isquemia de 30 minutos seguida de perfusión de 30 minutos y al finalizar la misma. Ello supuso :

2.1.- Diseñar y optimizar un sistema de digitalización y medida de señales biológicas ajustado a nuestro modelo experimental.

2.2.- Analizar los efectos del CPA sobre los parámetros de contractilidad control del septum interventricular aislado y perfundido arterialmente del corazón de conejo (tiempos para inicio de contracción, $+dT/dt$ máximo, 50% de contracción, pico, $-dT/dt$ máximo y 90% de relajación; tensión de reposo, amplitud contráctil y valor del $+dT/dt$

máximo y del $-dT/dt$ máximo).

2.3.- Analizar el efecto en el tiempo que produce la isquemia global de 30 minutos sobre los parámetros anteriores, así como durante la reperfusión de 30 minutos tras la isquemia. Elaborar un modelo cinético aplicable a los mismos y calcular parámetros característicos (constantes de tiempo).

2.4.- Analizar las modificaciones que induce el CPA sobre los parámetros anteriores.

2.5.- Evaluar funcionalmente el efecto antiisquémico (máximo incremento de tensión de reposo, porcentaje de recuperación de contractilidad sobre valores preisquémicos) que pudiera presentar el CPA.

3.- Valorar el efecto antiisquémico del CPA sobre *parámetros bioquímicos*, como marcadores de daño irreversible del sarcolema, tras isquemia global de 30 minutos. Para ello se cuantificó la liberación en el líquido de perfusión de creatinfosfokinasa (CPK), la aspartato-aminotransferasa (ASAT/GOT) y la lactato-deshidrogenasa (LDH) antes de la isquemia (valor control) y en los intervalos de reperfusión 0-2, 5-7, 15-17 y 28-30 minutos en experimentos control y bajo tratamiento con CPA.

4.- Valorar el efecto antiisquémico del CPA sobre *parámetros morfológicos* (microscopía óptica y electrónica) de las alteraciones inducidas tras 30 minutos de isquemia y reperfusión.

El modelo experimental del tabique interventricular del corazón de conejo, aislado y perfundido arterialmente según la técnica descrita por Langer y Brady (1968), fue validado para estudios de isquemia global y reperfusión por Bourdillon y Poole-Wilson (1982). Constituye una técnica óptima para nuestros propósitos de análisis funcional, enzimático y estructural de la isquemia de larga duración bajo condiciones control o de intervención farmacológica (Reimer y Jennings, 1986). La isquemia de 30 minutos de duración, si bien se considera isquemia prolongada, presenta unas características intermedias entre la situación reversible que implica la isquemia de corta duración (15-20 minutos) y la isquemia de 1 hora de duración con intenso daño celular global, por lo que puede suponer un punto de inflexión en el que la eficacia de las intervenciones farmacológicas puede ser más fácilmente observable, tanto desde el punto de vista funcional como morfológico o enzimático (Reimer y Jennings, 1986).

Como bloqueante de la SERCA elegimos el CPA, frente a la thapsigargina, por su carácter más selectivo y mayor potencia bloqueadora en preparaciones multicelulares, así como por haber mostrado relación dosis-efecto en los estudios de contusión miocárdica experimental (du Toit y Opie, 1994).

III.- MATERIAL Y METODOS

III.1.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL : TECNICA DEL TABIQUE INTERVENTRICULAR DE CORAZON DE CONEJO, AISLADO Y PERFUNDIDO ARTERIALMENTE. SISTEMA DE DIGITALIZACION.

Los experimentos se realizaron sobre el tabique (septum) interventricular de corazón de conejo NZW (2,3-3,2 Kg) según la técnica descrita por Langer y Brady (1968) y validada para estudios de isquemia global por Bourdillon y Poole-Wilson (1982).

Tras heparinizar (2.000 U.I. iv) y sacrificar a los conejos con sobredosis de pentobarbital (120 mg iv) a través de la vena dorsal de la oreja, se procede inmediatamente a la apertura del tórax por esternotomía y extracción del corazón. Se coloca éste sobre la cara ventricular izquierda en un soporte para disección, procediéndose entonces a la exéresis de las aurículas y de la porción externa de la pared ventricular derecha. Tras abrir la arteria coronaria izquierda, se identifica y canula la arteria del tabique interventricular mediante una cánula de polietileno (Clay Adams, PE 50, diámetro externo de 1,09 mm, diámetro interno de 0,38 mm) en la que previamente se ha moldeado una oliva terminal que impide su deslizamiento tras su inserción y sutura.

Los tabiques son perfundidos con solución nutriticia mediante una bomba peristáltica Gilson, mod. Minipuls HP4, de 4 vías, lo que permite

cambiar el tipo de solución perfundida gracias a un juego de llaves de tres pasos conectado al sistema de perfusión, sin que ello origine gradientes de flujo, presión o temperatura.

Se desechan aquellos tabiques interventriculares en los que el tiempo transcurrido desde la inyección del barbitúrico y el inicio de la perfusión es superior a 4 minutos.

Tras separar los músculos papilares situados en la cara derecha del tabique, la pared ventricular izquierda y el resto del tejido no perfundido, la preparación triangular resultante se monta fijándola por su base mediante unos forceps en ambos lados con el vértice superior unido a un transductor fuerza/desplazamiento (Grass, FTO3), mediante un hilo de seda de sutura.

El transductor se conecta a un polígrafo Grass, mod. 79D, con un módulo preamplificador D.C. Grass, mod. 7P1F, cuya señal amplificada se registra sobre papel y simultáneamente se obtiene su derivada en el tiempo mediante la introducción de la señal (obtenida a través de la salida J6 del preamplificador) en un módulo diferenciador analógico Grass 7P20. Ello permite, tras la adecuada calibración del equipo, el registro gráfico continuo tanto de la tensión desarrollada (g) como de la velocidad de desarrollo de la tensión (dT/dt ; g/seg). Simultáneamente se obtiene registro digitalizado mediante la introducción de la señal en una tarjeta diferenciadora PC-Lab mod. PCL-812PG, lo que permite medir

automatizadamente todos los parámetros contráctiles de cada contracción con gran precisión.

Los tabiques interventriculares se estimulan electricamente con pulsos rectangulares de 15 V y 5 msg de duración, a una frecuencia básica de estimulación de 1,2 a 2 Hz, mediante un estimulador Grass SD9.

Sólo se utilizan los tabiques interventriculares que en los momentos iniciales presentan 8 g o más de tensión desarrollada y tienen 10 g o menos de tensión basal, a 28°C y 0,5 Hz.

La perfusión de los tabiques se realiza con Tyrode a flujo constante, procurando obtener un flujo medio de 2,15 ml/min/g de tejido. La composición del Tyrode es la siguiente, (mM): NaCl, 114; KCl, 5; MgCl₂, 1; CaCl₂, 1,8; NaH₂PO₄, 0,43; glucosa, 5,5 y NaHCO₃ hasta un pH de 7,4 (aproximadamente 28 mM). Esta solución de Tyrode se oxigena con carbógeno (95 % de O₂ y 5 % de CO₂).

Los tabiques interventriculares se colocan en una cámara termostatzada, al objeto de realizar los experimentos a una temperatura constante de $32 \pm 0,25$ °C. Las temperaturas de trabajo se controlan continuamente mediante un teletermómetro (Panlab, mod. pb 0331) y una aguja Thermistor (ISY, 524) introducida en la masa muscular. La temperatura de la cámara se controla mediante una sonda de

temperatura (YSI, 401) y un teletermómetro digital Cibertec, mod.TT1.

El líquido de perfusión se calienta a su paso por el sistema mediante una resistencia de calentamiento acoplada a una fuente de corriente continua de voltaje regulable. El interior de la cámara se mantiene a la temperatura deseada mediante un radiador relleno de agua calentada a la temperatura que se precise mediante una resistencia eléctrica, y a través del cual se burbujea gas nitrógeno.

Todas las preparaciones se estabilizan durante, al menos, 45 minutos previamente a introducir cualquier variación correspondiente al protocolo experimental.

Al final de cada experimento, el tabique interventricular se seca ligeramente con papel de filtro, pesándose y desecándose en estufa hasta peso constante.

III.1.1.-MEDIDA AUTOMATIZADA DE LAS CONTRACCIONES.

Las medidas automatizadas de las contracciones se han realizado en 4 pasos sucesivos:

1º. Registro en disco duro.

La señal obtenida a través de la salida J6A del módulo amplificador del oscilógrafo fue introducida en una tarjeta convertidora analógico / digital PCL-812PG situada en un ordenador personal (Investrónica PC 286/16). La adquisición de la señal fue sincronizada con la salida del pulso eléctrico de sincronismo (pausa de 5 mseg) del estimulador eléctrico usado para estimular la preparación. La tarjeta digitalizadora fue manejada mediante el programa SantosUno (Anexo I, pag 196), en lenguaje Pascal, desarrollado específicamente para esta aplicación. Se utilizaron las subrutinas de programación en Pascal (inicialización, fijación de ganancia, selección de canal, adquisición en forma sincronizada,...) proporcionadas por el fabricante de la tarjeta. El programa SantosUno genera en el disco duro dos ficheros de salida con el nombre asignado al experimento, uno con extensión .DAT y otro .BIN (Tabla 2). El primero contiene los datos de calibración del sistema y parámetros de digitalización (número de puntos fijados para cada contracción y frecuencia de muestreo; habitualmente 6 mseg y 120 puntos) (Tabla 3). El fichero .BIN contiene los datos de las contracciones

digitalizadas, en formato binario. El primer número de cada serie correspondiente a cada contracción es un número identificador de correspondencia al tiempo de experimento (basal, efecto del fármaco, isquemia, perfusión), número clave que se introduce a través del teclado.

En cada experimento de isquemia se han digitalizado alrededor de 100 contracciones sucesivas en condiciones basales, otras 100 al final del tratamiento farmacológico, continuamente desde el inicio de la isquemia hasta la aparente anulación de la actividad contráctil (alrededor de 7 min), desde el inicio de la perfusión durante otros 5 - 10 min y las últimas 100 contracciones al final del tiempo de perfusión.

2º. Conversión de datos a formato ASCII.

Este segundo paso se realiza mediante el programa SantosDos (Anexo II, pag 204). Este programa convierte los ficheros de datos desde formato binario a formato ASCII. Genera un fichero con el mismo nombre del experimento ya asignado pero con la extensión .PRN (Tabla 4). Además, cuenta el número de contracciones registradas y permite visualizar en pantalla bien todo o bien la parte del experimento que se desee. Ello se realiza indicando a través del teclado el número de contracción inicial y final del trozo que se desee visualizar, observándose en cualquier caso en idéntica forma al registro analógico en papel.

3. Medida automatizada de diversos parámetros de contracción.

Este tercer paso se realiza mediante el programa SantosTres (Anexo III, pag 208). Realiza medidas sobre las contracciones almacenadas en un fichero .PRN. Este programa genera un fichero con los resultados de las medidas al que asigna el mismo nombre del experimento seleccionado y la extensión .RES (Tablas 2 y 5). Aparte de ello, grafica en pantalla cada contracción y su derivada, así como la contracción y derivada medias de todas las contracciones basales (control). La forma gráfica puede ser manual o automática. En el primer caso permite seleccionar el número de contracción que se desea visualizar y contiene además en pantalla los valores de los parámetros medidos. En este caso el avance a través del fichero .prn se realiza de forma unitaria (contracción a contracción), a través de una orden por teclado. En el segundo caso existe además de la gráfica ya descrita una representación acumulada, con un avance automático de una contracción cada 0,1 segundo. En ambos casos indica el total de contracciones registradas, el número de contracción actual y, en el caso de la isquemia, el tiempo transcurrido de la misma.

Se mejoró la exactitud de las medidas disminuyendo el ruido mecánico registrado procediendo a un suavizado de los datos, de la forma:

$$X_n = (X_{n-1} + 2X_n + X_{n+1}) / 4$$

siendo X el valor contenido en el canal de registro n. Experimentalmente

se determinó que 1 suavizado optimizaba globalmente el proceso de medida en condiciones control. Cuando el valor de la amplitud es menor del 51% del inicial, se suaviza progresivamente hasta un máximo de 6 suavizados y 5 de la derivada en valores próximos a cero.

El programa detecta contracciones extrasistólicas y no almacena en el fichero .RES las medidas realizadas sobre éstas. Los criterios para considerar que una contracción es extrasistólica se basan en la comparación de las medidas de la contracción actual con la media de las 8 precedentes no extrasistólicas. Se considera extrasístole (salvo en reperfusión) cuando se da alguna de estas circunstancias:

- # Tensión basal superior en un 10%.
- # Inicio de la contracción > 3 canales.
- # Amplitud mayor de un 4%.
- # Tensión de reposo final > 20%.

Los parámetros que analiza y registra en fichero para cada contracción son (Figura 8):

tensión de reposo, calculada como la media de tensión (expresada en mV) de los n canales iniciales, hasta que el valor del siguiente difiere en más de 1 desviación típica de los precedentes.

t de inicio de contracción, expresado como el número de canal en que se encuentra el inicio de contracción, calculado según el procedimiento anterior.

t para el pico de contracción, expresado como el número de

canal en que se encuentra el máximo valor de mV tras 1 suavizado, en los n canales utilizados.

amplitud contráctil expresada como la diferencia en mV entre el valor del máximo y de la tensión de reposo.

t para el 50% de la contracción expresado como el número de canal en que se encuentra dicho valor.

50 % de la contracción, valor (expresado en mV) del canal que más se aproxima al valor de la tensión de reposo más el 50% de la amplitud, empezando a seleccionar desde el inicio de la contracción.

t para el 90% de la relajación expresado como el número de canal en que se encuentra dicho valor.

90 % de la relajación, valor (expresado en mV) del canal que más se aproxima al valor de la tensión de reposo más el 10% de la amplitud, empezando a seleccionar desde el máximo de la contracción.

t para el máximo de la velocidad de contracción expresado como el número de canal en que se encuentra dicho valor.

máximo de la velocidad de contracción ($+dT/dt$ max), máximo positivo obtenido tras la diferenciación matemática del valor de los n canales, expresada en mV.

t para el máximo de la velocidad de relajación expresado como el número de canal en que se encuentra dicho valor.

máximo de la velocidad de relajación ($-dT/dt$ max), máximo negativo obtenido tras la diferenciación matemática del valor de los n canales, expresada en mV.

Para verificar el buen funcionamiento del programa se obtuvo en una hoja de cálculo (Lotus 123) la contracción media de 106 contracciones controles sucesivas de un fichero *.prn (sobre las que no se hizo suavizado de la función) para realizar la medida manual de estos parámetros. También se calcularon las medias de estos parámetros sobre las medidas automatizadas que se realizaron sobre cada una de las 106 contracciones mediante el programa descrito, obteniéndose los siguientes resultados:

(n=106)	MANUAL	AUTOMATIZADA	(%)
# Tensión de reposo	102,75	101,97 ± 2,79	-0,76
# t inicio contracción	6	6,08 ± 1,41	1,33
# t pico de contracción	39	39,04 ± 0,44	0,10
# amplitud contráctil	566,58	566,07 ± 2,78	-0,09
# t 50% de la contracción	19	19,06 ± 0,23	0,32
# 50 % de la contracción	374,77	375,46 ± 6,02	0,18
# t 90% de la relajación	74	73,71 ± 0,45	-0,39
# 90 % de la relajación	155,07	157,42 ± 3,98	1,52
# t para el +dT/dt max	16	15,73 ± 1,39	-1,69
# +dT/dt max	27,44	27,51 ± 0,50	0,26
# t para el -dT/dt max	59	58,71 ± 1,29	-0,49
# -dT/dt max	-23,60	-23,69 ± 0,50	0,38

4º. Cálculos y representaciones gráficas. La transformación de unidades (mV a g,...), el análisis de medias, ajustes a funciones, análisis estadístico y representaciones gráficas ha sido realizado mediante la utilización de las hojas de cálculo Lotus 123, Excel 5.0 y PowerPoint.

Según las condiciones experimentales generales arriba descritas, se procedió a realizar las diferentes series de experimentos detallados a continuación.

I. DIGITALIZACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE DATOS.

<u>PROGRAMA</u>	<u>ACTUACION</u>	<u>GENERA</u>
SANTOSUNO	TARJETA DIG.	<NOMBRE> .DAT (calibración, par. digitaliz.) <NOMBRE> .BIN (registro contracciones)

II. CONVERSION ASCII Y GRAFICA GLOBAL EN PANTALLA.

<u>PROGRAMA</u>	<u>ACTUACION</u>	<u>GENERA</u>
SANTOSDOS	<NOMBRE> .BIN	<NOMBRE> .PRN (datos en ASCII, gráfico)

III. MEDIDA Y GRAFICA UNITARIA EN PANTALLA.

<u>PROGRAMA</u>	<u>ACTUACION</u>	<u>GENERA</u>
SANTOSTRES	<NOMBRE> .PRN	<NOMBRE> .RES (medidas, supresión extrasíst.)

IV. ANALISIS DE DATOS.

<u>PROGRAMA</u>	<u>ACTUACION</u>	<u>GENERA</u>
LOTUS 123	<NOMBRE> .RES	<NOMBRE> .FIN (estadística)
EXCEL	<NOMBRE> .RES	<NOMBRE> .FIN (ajustes a funciones)
POWERPOINT	<NOMBRE> .RES	<NOMBRE> .FIN (gráficos)

TABLA 2.- Descripción ordenada de los pasos realizados con los diversos programas hasta obtener la medida automatizada de los diversos parámetros contráctiles.

Período de muestreo: 6
Número de muestras por ciclo: 120
Media inferior: -286.04
Media superior: 404.69

Tabla 3.- Aspecto del contenido de un fichero .DAT. El período de muestreo se expresa en mseg. Número de muestras indica el número de puntos que se registran para cada contracción. El producto período de muestreo x número de muestras indica el tiempo total de registro tras el pulso de sincronismo del estimulador eléctrico (720 mseg en nuestro caso). Media inferior y superior representan la calibración del equipo. Son el valor medio en mV de 200 medidas realizadas con una tensión de 0 y 10 g sobre el transductor, respectivamente.

-67 106 102 109 104 106 105 119 123 142 163 185 210 240 264 290 320
 342 374 398 426 450 470 496 519 540 559 572 591 604 619 628 635 646
 652 659 663 662 667 667 665 662 659 655 646 644 638 626 609 600 581
 565 550 526 510 485 461 442 415 397 370 347 330 304 286 266 246 235
 215 205 191 176 172 155 151 142 133 134 123 125 285 268 252 231 223
 202 192 179 168 164 150 144 139 131 132 123 122 120 115 118 111 113
 113 108 113 108 109 110 105 110 104 109 110 107 111 106 107 109 102
 108 104 108 108 100 109 103 105 107 102 108 103 106 106 100 106 103
 104
 -67 103 109 103 106 106 108 118 124 146 165 186 217 236 268 294 321
 350 372 402 426 453 476 497 522 539 560 577 591 607 617 630 640 645
 656 660 664 667 665 669 665 664 661 654 652 639 632 621 607 594 577
 560 544 522 504 479 461 439 412 392 366 346 327 301 284 261 245 231
 210 203 186 174 169 154 152 140 134 133 123 125 118 114 117 109 115
 111 107 110 106 110 107 105 109 101 109 105 104 107 103 107 105 103
 107 101 108 104 103 108 100 105 103 103 107 101 105 103 103 107 102
 104
 -67 106 102 107 101 104 110 113 131 140 164 187 209 240 264 292 321
 344 377 398 425 451 472 497 517 541 558 573 591 604 620 627 636 647
 653 660 660 664 666 664 668 662 657 655 647 641 629 619 609 590 582
 561 542 525 503 484 461 436 417 390 371 347 324 306 281 264 248 227
 218 198 191 180 167 162 147 145 140 130 134 122 124 121 114 118 111
 115 114 107 115 108 111 111 106 111 107 110 111 106 113 108 108 109
 105 111 108 107 108 106 110 106 107 108 104 111 106 107 107 105 111
 104

TABLA 4.- Aspecto del contenido de un fichero .PRN. Estos datos corresponden a 3 contracciones controles (-67 = contracción basal). Los 119 números siguientes a cada -67 corresponden al valor de tensión obtenida cada 6 mseg.

1	-67	105	7	40	560	20	398	74	158	15	27	58	-23
2	-67	102	3	39	563	19	371	74	157	15	27	59	-23
3	-67	104	4	40	568	20	401	74	160	14	27	58	-23
4	-67	103	3	39	563	19	374	74	157	17	28	58	-23
5	-67	104	7	40	561	19	373	74	159	14	27	58	-23
6	-67	104	5	39	567	19	375	74	158	16	27	58	-23
7	-67	104	6	38	562	19	373	74	157	16	27	59	-24
8	-67	103	5	39	566	19	374	74	161	16	27	59	-24
9	-67	105	6	39	563	19	374	74	158	15	27	59	-24
10	-67	104	5	39	563	19	374	74	158	16	27	56	-23
11	-67	106	5	39	565	19	378	74	160	14	27	59	-23
12	-67	105	4	39	563	19	374	74	157	16	27	57	-23
13	-67	104	4	38	564	19	375	74	161	18	28	59	-23
14	-67	106	5	39	563	19	378	74	158	16	27	58	-23
15	-67	104	6	39	564	19	375	74	158	14	27	57	-23
16	-67	103	5	39	569	19	377	74	160	15	27	60	-24
.....													
577	-3	134	6	46	499	23	375	92	184	18	20	68	-17
578	-3	133	7	47	499	24	392	93	183	19	20	71	-17
579	-3	134	6	46	502	23	376	92	185	22	21	68	-17
580	-3	134	8	46	501	23	375	92	185	21	21	69	-17
581	-3	131	3	46	507	23	376	93	182	21	21	69	-17
585	-3	130	3	46	516	23	388	93	181	18	21	67	-17
587	-3	130	3	46	502	23	373	93	180	24	21	68	-17
589	-3	132	5	45	497	23	372	93	180	19	20	68	-17
590	-3	132	6	45	501	24	391	93	183	23	21	72	-17
591	-3	134	7	46	494	24	390	93	182	19	20	69	-17
592	-3	131	3	46	500	24	391	94	181	24	21	70	-17
593	-3	136	7	46	495	24	391	92	185	19	20	68	-17

TABLA 5.- Aspecto del contenido de un fichero .RES. Las columnas de izquierda a derecha significan : número de la contracción, tipo de contracción (-67 = contracción basal; -3 tras la acción del fármaco, CPA), Tensión de reposo, tiempo (t) de inicio de la contracción, t para el pico de contracción, amplitud contráctil, t para el 50% de la contracción, 50 % de la contracción, t para el 90% de la relajación, 90 % de la relajación, t para el +dT/dt max, +dT/dt max, t para el -dT/dt max, -dT/dt max. Los saltos en la numeración de la 1ª columna indican contracciones extrasistólicas.

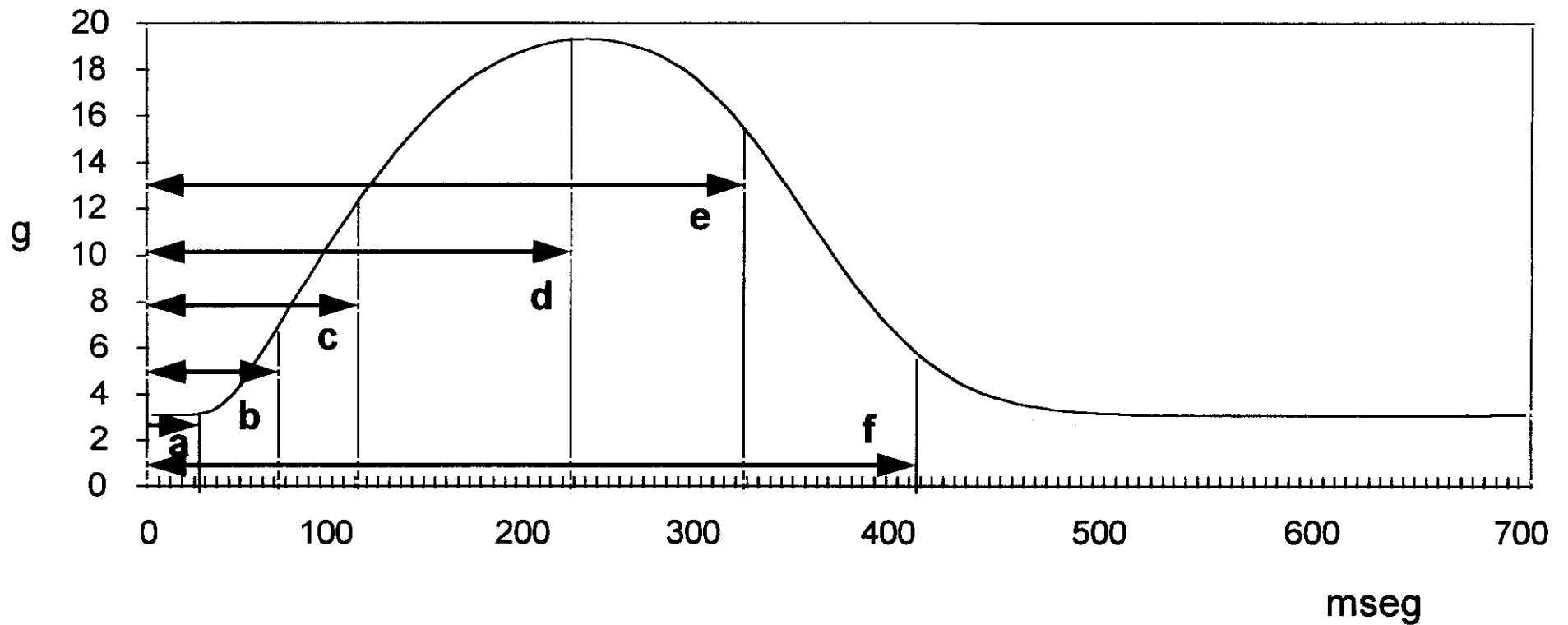


Figura 8.- Representación esquemática de las medidas realizadas sobre cada contracción: (a) tiempo de inicio de contracción; (b) $+dT/dt$ max y su tiempo; (c) tiempo para 50% de contracción; (d) pico de contracción y su tiempo; (e) $-dT/dt$ max y su tiempo; (f) tiempo para el 90% de relajación.

III.2.- EFECTOS DEL ACIDO CICLOPIAZONICO (CPA) SOBRE PARAMETROS CONTRACTILES.

III.2.1.- CURVAS DOSIS-EFECTO Y EXPERIMENTOS CONTROL.

Siguiendo el procedimiento experimental descrito anteriormente, realizamos, en primer lugar, curvas dosis-efecto acumulativas ($n=3$) utilizando soluciones de Tyrode conteniendo 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M, durante 30 minutos, obteniendo registro continuo analógico y digital, en condiciones control y al final de cada una de las sucesivas concentraciones.

En segundo lugar, analizamos los efectos de una concentración única de CPA 10^{-5} M ($n=9$), administrada durante 30 minutos valorando los efectos sobre la contracción de forma continua y midiendo para ello los mismos parámetros contráctiles descritos en el apartado anterior.

En tercer lugar, realizamos el mismo estudio utilizando una concentración única de CPA 10^{-6} M ($n=8$). Analizamos igualmente el efecto de una dosis de CPA $3 \cdot 10^{-5}$ M ($n=2$) sobre la contractilidad en condiciones basales.

Con el fin de descartar que los efectos encontrados al administrar CPA pudieran ser debidos al efecto del disolvente empleado, dimetil-

sulfóxido (DMSO), realizamos dos experimentos añadiendo exclusivamente el disolvente a la misma concentración que aparecería al administrar el CPA 10^{-5} M, 100 μ l en 100 ml de Tyrode. Los registros y medidas a realizar sobre parámetros contráctiles fueron los mismos que en los experimentos anteriores.

III.3.- ESTUDIOS SOBRE PARAMETROS DE CONTRACTILIDAD EN ISQUEMIA MIOCARDICA.

III.3.1.- ISQUEMIA GLOBAL. TECNICA GENERAL Y DESCRIPCION DEL MODELO. EXPERIMENTOS CONTROL.

Tras estabilizar las preparaciones ($n=11$) durante 45 minutos con Tyrode como solución nutritiva, se procedió según la técnica de isquemia global descrita para esta preparación por Bourdillon y Poole-Wilson (1982). En condiciones control, y tras 30 minutos de perfusión, se procedió a parar el flujo durante 30 minutos, tiempo a partir del cual se reperfundió la preparación durante otros 30 minutos.

Se controló la temperatura de los tabiques durante el tiempo de isquemia mediante el sistema termostatzado de calentamiento de la cámara, manteniéndose estable a $32 \pm 0,25$ °C.

Los parámetros mecánicos analizados para cuantificar el daño

isquémico fueron el máximo cambio en la tensión de reposo y el porcentaje de recuperación tras 30 minutos de reperfusión, medido frente a los valores inmediatamente anteriores a la isquemia (Salinas *et al*, 1995).

Se caracterizaron otros parámetros contráctiles en condiciones basales y durante la isquemia-reperfusión para analizar el efecto de la isquemia sobre los mismos y la cronología de estas modificaciones. Estos parámetros incluyen: duración de la contracción, amplitud máxima de la contracción, tiempo necesario para alcanzar el pico de la contracción (tPC), tiempo para inicio de contracción, tiempo para alcanzar el 50% de la contracción, tiempo para el 90% de la relajación, máxima velocidad de contracción (+dT/dt máx) y su tiempo, máxima velocidad de relajación (-dT/dt max) y su tiempo.

III.3.2.- EXPERIMENTOS CON ACIDO CICLOPIAZONICO (CPA) EN ISQUEMIA MIOCARDICA.

De acuerdo con la metodología expuesta, se utilizaron soluciones de Tyrode conteniendo 10^{-5} M (n=9), 10^{-6} M (n=8), 3×10^{-5} M (n=2), así como DMSO, 100 μ l en 100 ml de Tyrode (n=2), perfundidas durante 30 minutos inmediatamente antes de inducir isquemia global durante 30 minutos. Tras este período se reperfundió con solución Tyrode libre de fármaco.

En tres experimentos se realizó perfusión durante 30 minutos en preischemia con CPA 10^{-6} M y reperfusión tras los 30 minutos de isquemia con la misma solución de CPA 10^{-6} M durante media hora.

En otros cuatro experimentos se realizó isquemia de 30 minutos sin administración previa del fármaco, tras lo cual se reperfundió con Tyrode conteniendo CPA 10^{-6} M durante 30 minutos.

Se registraron y midieron de forma continua en isquemia y reperfusión los mismos parámetros contráctiles descritos en el apartado de isquemia control.

III.4.- ESTUDIOS SOBRE PARAMETROS BIOQUIMICOS DE DAÑO CELULAR EN MIOCARDIO ISQUEMICO. DETERMINACION ANALITICA.

Se procedió a la recogida del líquido de perfusión efluente del tabique y a la determinación analítica en el mismo de la actividad de las enzimas creatin-fosfokinasa (CPK), aspartato-aminotransferasa (ASAT ó GOT) y lactato-deshidrogenasa (LDH), como marcadores de daño irreversible del sarcolema.

El líquido efluente procedente del tabique interventricular fue recogido en diversos tiempos: 2 minutos antes de la isquemia para

obtener un control basal, y durante la reperfusión en los instantes 0-2 minutos, 5-7 minutos, 13-15 minutos y 28-30 minutos.

Se realizaron determinaciones en experimentos de isquemia control de 30 minutos (n=8), CPA 10^{-6} (n=7), CPA 10^{-6} M administrado en preisquemia y reperfusión (n=3) y CPA 10^{-6} M administrado exclusivamente durante la reperfusión (n=4).

Las determinaciones se llevaron a cabo en un analizador multicanal discreto BM/Hitachi 747 empleando el "Método standard optimizado" de la Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie (Gruber, 1978).

III.5.- ESTUDIOS SOBRE PARAMETROS MORFOLOGICOS DE DAÑO CELULAR EN EL MIOCARDIO ISQUEMICO. MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Para los estudios de microscopía electrónica se tomaron muestras de miocardio de aproximadamente 1 mm de lado que fueron fijadas por técnicas de inmersión. La toma de muestra se realizó en la porción de la base, tomando como referencia su proximidad a la arteria del tabique interventricular.

El tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y su fijación no superó en ningún caso los 30 segundos, utilizándose con este fin glutaraldehído al 3%.

Las muestras se mantuvieron en el fijador durante al menos dos horas y, a continuación, se eliminó el exceso de fijador mediante un lavado de 15 minutos en buffer Sorensen (0,1 M de KH_2PO_4 y 0,1 M de Na_2HPO_4 ; pH 7,4). Se realizó una postfijación en tetróxido de osmio al 2% en buffer durante 2 h. Por último, las piezas se contrastaron durante 30 minutos en acetato de uranilo al 2% en buffer Michaelis (0,025 M, pH 7, 440 mOsm/l, con 2 nmoles de calcio).

Todas las piezas fueron deshidratadas en acetonas de gradaciones crecientes y finalmente en óxido de propileno, siendo a continuación incluidas en Araldita.

A fin de seleccionar las zonas que iban a ser estudiadas ultramicroscópicamente, todos los bloques fueron previamente seccionados en cortes semifinos de 1 μm de espesor, mediante un ultramicrotomo Ultratome LKB-IV, y teñidos con azul de toluidina al 0,5% en borato sódico al 3%.

De las áreas seleccionadas se obtuvieron cortes ultrafinos de 20-40 nm de espesor con el Ultratome LKB-IV, recogándose en rejillas de 400 mesh. Estos cortes se contrastaron para la observación electromicroscópica con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las preparaciones así obtenidas se estudiaron y fotografiaron en un microscopio JEOL 100-C con un potencial de aceleración de 75-100 KV.

III.6.- ANALISIS ESTADISTICO.

La comparación de medias fue analizada mediante el método de la t de Student para datos apareados o no apareados dependiendo del tipo de experimento. Los datos se expresan como la media \pm desviación típica, salvo que se señale lo contrario. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

III.7.- FARMACOS Y OTROS PRODUCTOS.

El ácido ciclopiazónico (CPA) se obtuvo de Sigma. El resto de productos o reactivos fueron al menos de pureza analítica.

Las soluciones del CPA se realizaron en dimetil-sulfóxido. Las diluciones posteriores fueron realizadas directamente en la solución Tyrode.

IV.- RESULTADOS

IV.1.- ANALISIS INTERGRUPO DE LA HOMOGENEIDAD DE LOS GRUPOS DE ANIMALES Y CONDICIONES DE EXPERIMENTACION.

Las características generales que podrían afectar a la homogeneidad de los grupos de experimentación incluyen: peso del conejo, peso final del tabique interventricular o septum y frecuencia de estimulación, así como la amplitud contráctil desarrollada por la preparación y la tensión de reposo medidas tras 45 minutos de estabilización en condiciones basales.

En la tabla 6 se recogen los datos relativos a los cinco grupos experimentales sobre los que se realizó isquemia y perfusión: grupo control (n=11), experimentos con CPA 10^{-6} M administrado durante 30 minutos antes de la isquemia (preisquemia) (n=8), CPA 10^{-5} M administrado durante 30 minutos en la preisquemia (n=9), CPA 10^{-6} M administrado durante la preisquemia y la perfusión (postisquemia) (n=3), y CPA 10^{-6} M perfundido sólo durante la perfusión (n=4). Los resultados no presentan diferencias estadísticamente significativas entre los diversos grupos considerados.

Las características de los experimentos realizados con DMSO (n=2) y CPA 3×10^{-5} M (n=2) tampoco presentan diferencias aparentes respecto a los grupos anteriores.

	ISQUEMIA CONTROL	CPA 10⁻⁶M (pre)	CPA 10⁻⁵M (pre)	CPA 10⁻⁶M (pre y post)	CPA 10⁻⁶M (sólo post)
	(n = 11)	(n = 8)	(n = 9)	(n = 3)	(n = 4)
PESO CONEJO (Kg)	2,64 ± 0,17	2,41 ± 0,93	2,76 ± 0,28	2,54 ± 0,20	2,48 ± 0,52
PESO SEPTUM (g)	1,17 ± 0,19	1,19 ± 0,19	1,05 ± 0,16	1,20 ± 0,20	1,19 ± 0,15
FRECUENCIA (Hz)	1,65 ± 0,23	1,45 ± 0,25	1,58 ± 0,30	1,50 ± 0,05	1,55 ± 0,22
AMPLITUD INICIAL (g)	12,94 ± 4,71	15,19 ± 3,89	12,07 ± 2,08	16,03 ± 4,23	12,98 ± 2,11
TENSION REPOSO (g)	7,49 ± 1,70	6,54 ± 0,82	6,63 ± 0,95	6,25 ± 1,20	6,67 ± 0,68

TABLA 6.- Características de los diversos grupos de experimentación. No existen diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

IV.2.- EFECTOS DEL ACIDO CICLOPIAZONICO (CPA) SOBRE CONTRACTILIDAD MIOCARDICA.

IV1.2.1.- CURVAS DOSIS-EFECTO ACUMULATIVAS.

En la figura 9 se observa el efecto sobre la tensión de reposo basal del CPA perfundido de forma acumulativa en dosis crecientes de 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} y 10^{-6} M ($n = 3$), administradas durante 30 minutos cada una (tiempo necesario hasta que se estabilizaba la preparación una vez introducido el fármaco). Se aprecia una ligera tendencia a la disminución de la tensión de reposo que no llega a ser estadísticamente significativa en ningún momento.

Sin embargo, a nivel de amplitud de contracción desarrollada, la caída es más manifiesta y empieza a ser significativa desde el punto de vista estadístico tras añadir la dosis de CPA de 10^{-6} M ($p < 0,05$), cayendo un $12,86 \pm 5,57$ % respecto a la basal (Figura 10).

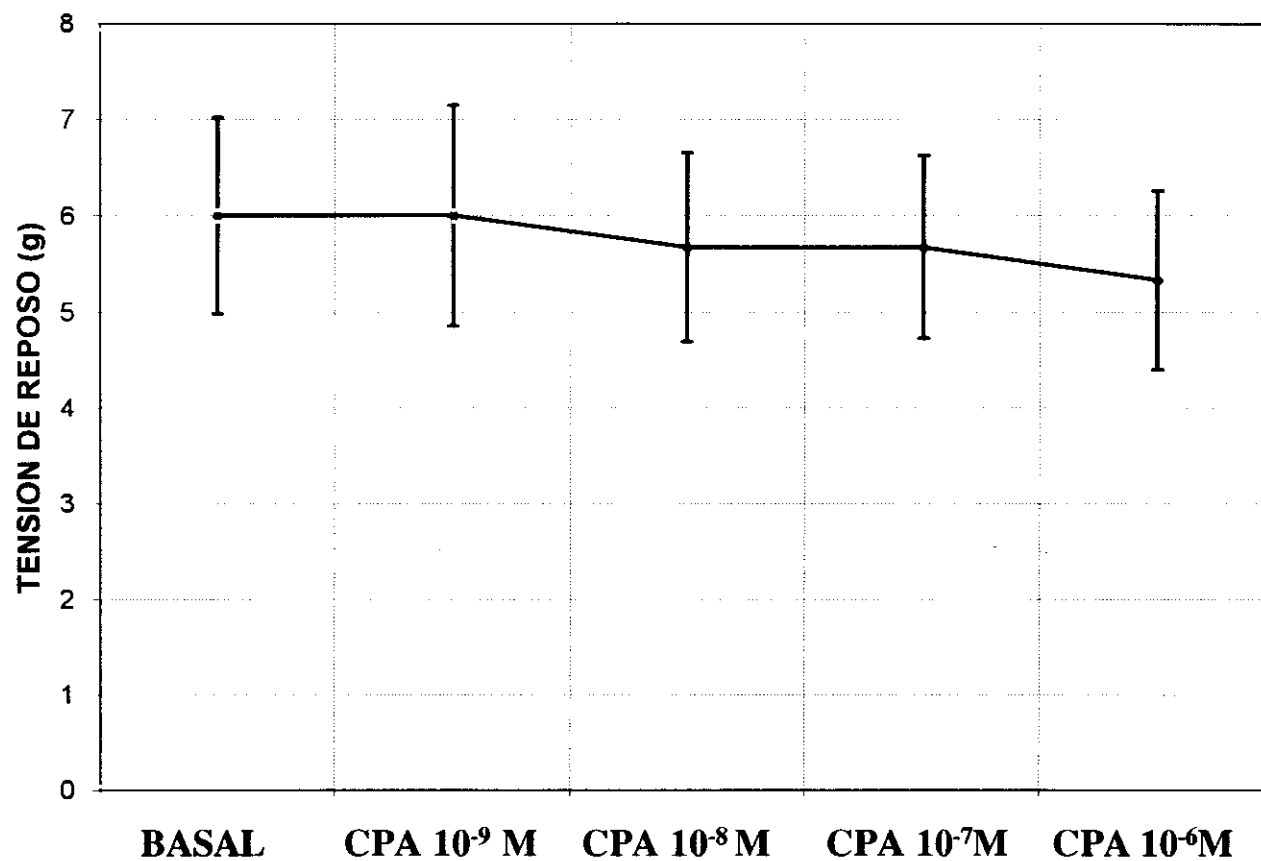


FIGURA 9.- Curva dosis-efecto sobre tensión de reposo del CPA administrado en dosis acumulativas, 10⁻⁹ M - 10⁻⁶ M, perfundidas durante 30 minutos cada una (n =3). Las diferencias no son estadísticamente significativas en ningún caso.

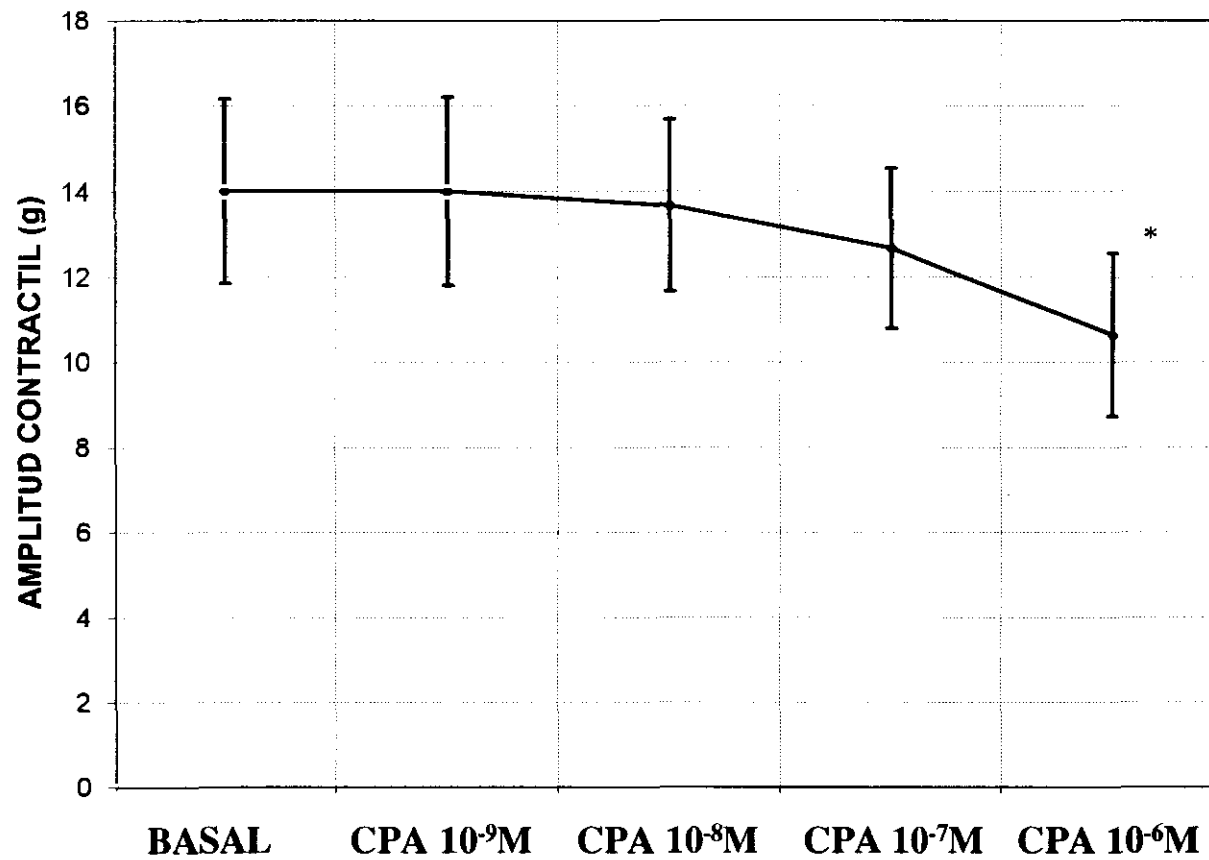


FIGURA 10.- Curva dosis- efecto sobre amplitud de contracción del CPA administrado en dosis acumulativas (10^{-9} - 10^{-6} M) durante 30 minutos cada una ($n = 3$) (* $p < 0,05$).

IV.2.2.- EFECTOS UNITARIOS DEL CPA 10^{-6} M Y 10^{-5} M.

Se midió y registró el efecto aislado de dosis únicas de CPA (10^{-6} y 10^{-5} M), perfundidas durante 30 minutos, sobre los siguientes parámetros contráctiles : tensión de reposo, amplitud contráctil, $+dT/dt$ max, $-dT/dt$ max y sobre los tiempos de inicio, $+dT/dt$ max, 50% de contracción, pico, $-dT/dt$ max y 90% de relajación.

El CPA 10^{-6} M (n=8) a nivel de tensión de reposo, amplitud contráctil y velocidades máximas de contracción y relajación produjo pequeñas disminuciones no significativas en ningún caso (Figuras 11 y 12). Sobre la cronología de la contracción provocó un progresivo alargamiento de la misma con especial repercusión sobre la fase de relajación, donde las diferencias en los tiempos para $-dT/dt$ max ($10,84 \pm 4,20$ %) y 90% de relajación ($9,30 \pm 3,95$ %) empezaron a ser estadísticamente significativas respecto a los valores basales ($p < 0,05$, en ambos casos) (Figura 13). Si se consideran los tiempos de la fase de relajación medidos desde el tiempo para el pico, el alargamiento del tiempo para el $-dT/dt$ max fue de un 12,11% y el del tiempo para el 90% de relajación de un 5,09%, respecto a los valores basales. Los valores absolutos para cada variable se encuentran también recogidos en las tablas 7 y 8.

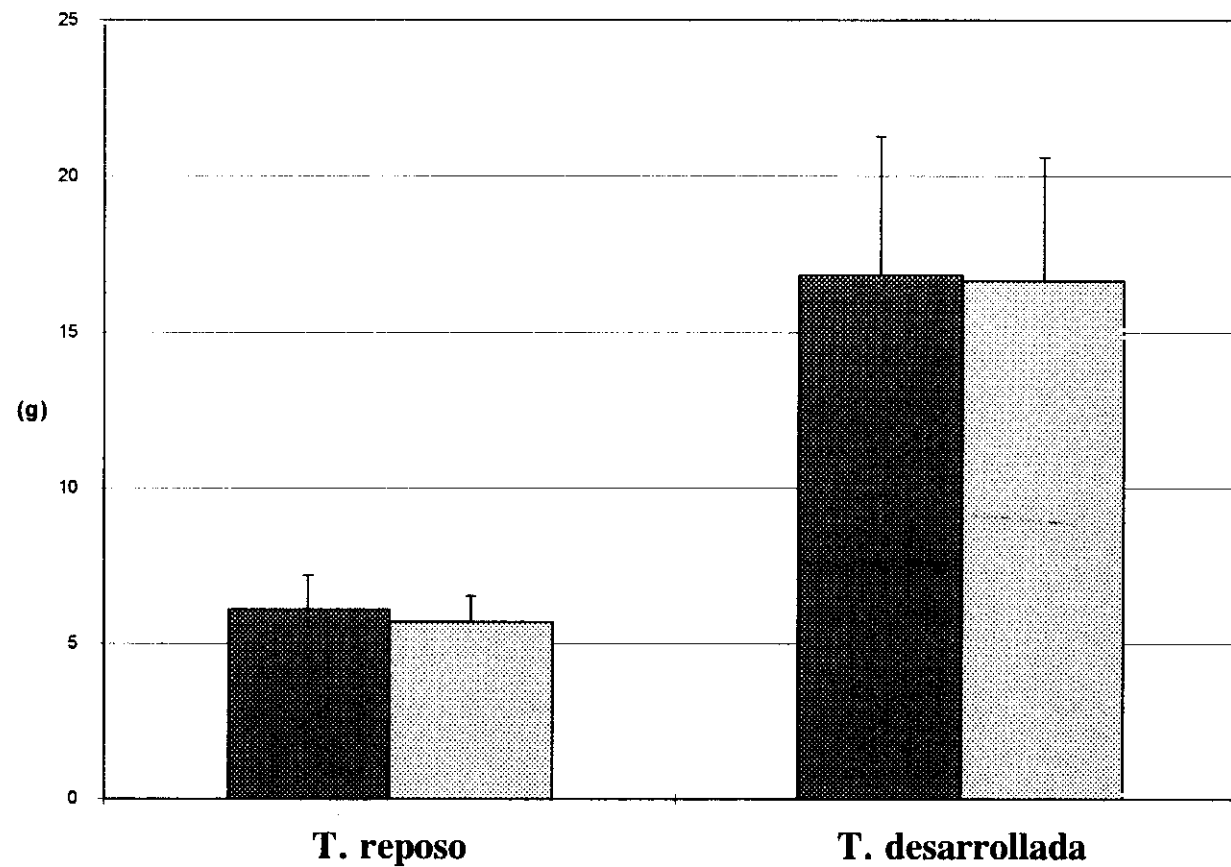


FIGURA 11.- Efectos del CPA 10⁻⁶ M (n =8) sobre la tensión de reposo y la amplitud contráctil o tensión desarrollada. Columna oscura: basal. Columna clara: tras 30 minutos con CPA 10⁻⁶ M. Las diferencias no son estadísticamente significativas en ningún caso.

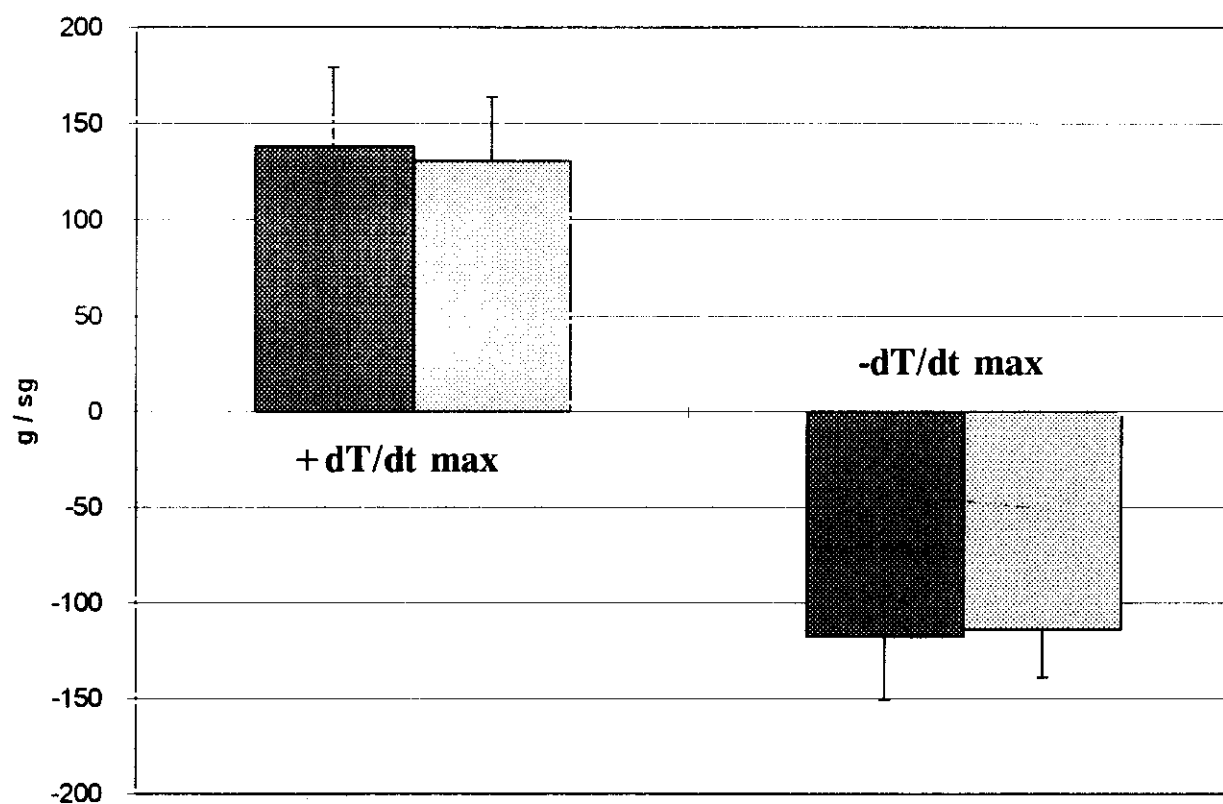


FIGURA 12.- Efecto del CPA 10⁻⁶ M (n =8) sobre la máxima velocidad de contracción (+dT/dt max) y la máxima velocidad de relajación (-dT/dtmax). Columna oscura: basal. Columna clara: tras 30 minutos con CPA 10⁻⁶ M. Las diferencias no son estadísticamente significativas en ningún caso.

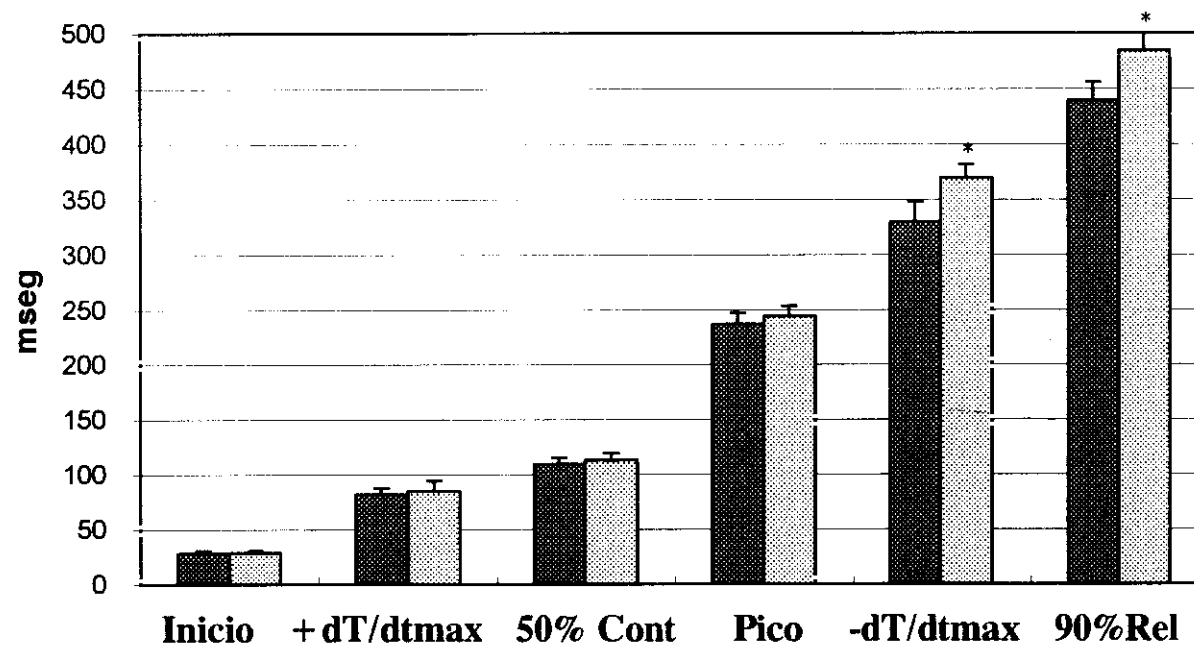


FIGURA 13.- Efecto del CPA 10^{-6} M ($n = 8$) sobre los tiempos de inicio de contracción, $+dT/dt_{max}$, 50% de contracción, pico, $-dT/dt_{max}$ y 90% de relajación. Columna oscura: basal. Columna clara: tras 30 minutos con CPA 10^{-6} M (* = $p < 0,05$).

Las diferencias obtenidas con CPA 10^{-5} M (n=9) fueron más notables. La tensión de reposo no se modificó de forma significativa, sin embargo, la amplitud contráctil sí que experimentó un descenso significativo ($15,67 \pm 0,37$ %; $p < 0,05$) tras 30 minutos de administración del fármaco (Figura 14). Los efectos sobre las máximas velocidades de contracción y relajación resultaron más notables, con un descenso del $+dT/dt$ max de un $39,31 \pm 3,01$ % de media ($p < 0,001$) y del $-dT/dt$ max de un $20 \pm 2,60$ % ($p < 0,01$) (Figura 15). El alargamiento de la contracción afecta a todos los tiempos registrados, siendo más evidente durante la fase inicial de contracción. El tiempo de inicio se alargó un $56,22 \pm 20,26$ % ($p < 0,05$), el tiempo para el $+dT/dt$ max un $81,42 \pm 16,12$ % ($p < 0,001$), el tiempo para el 50% un $49,57 \pm 4,69$ % ($p < 0,001$), el tiempo para el pico de contracción un $30,30 \pm 1,64$ % ($p < 0,001$), el tiempo para el $-dT/dt$ max un $24,88 \pm 1,74$ % ($p < 0,001$), y el tiempo para el 90% de relajación un $21,64 \pm 1,80$ % ($p < 0,001$) (Figura 16). Si se consideran los tiempos de la fase de relajación medidos desde el pico de contracción, el alargamiento del tiempo para el $-dT/dt$ max alcanza sólo un 20,32%, y la prolongación del tiempo para el 90% de relajación un 14,82%. Los valores absolutos aparecen recogidos en las tablas 7 y 8.

Los resultados obtenidos en los dos experimentos realizados con CPA 3×10^{-5} M siguen la línea de los obtenidos con CPA 10^{-5} M: la tensión de reposo no se modificó significativamente, la amplitud de contracción cayó un $16,14 \pm 1,01$ % ($p < 0,05$), el $+dT/dt$ max

descendió un $50,49 \pm 4,97$ % ($p < 0,001$) y el $-dT/dt$ max un $37,59 \pm 2,52$ % ($p < 0,001$). Los tiempos se alargaron de forma estadísticamente significativa en todos los casos y en un porcentaje algo mayor que el obtenido con CPA 10^{-5} M.

En los dos experimentos realizados con DMSO no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros contractiles registrados tras la administración del solvente respecto a los valores basales.

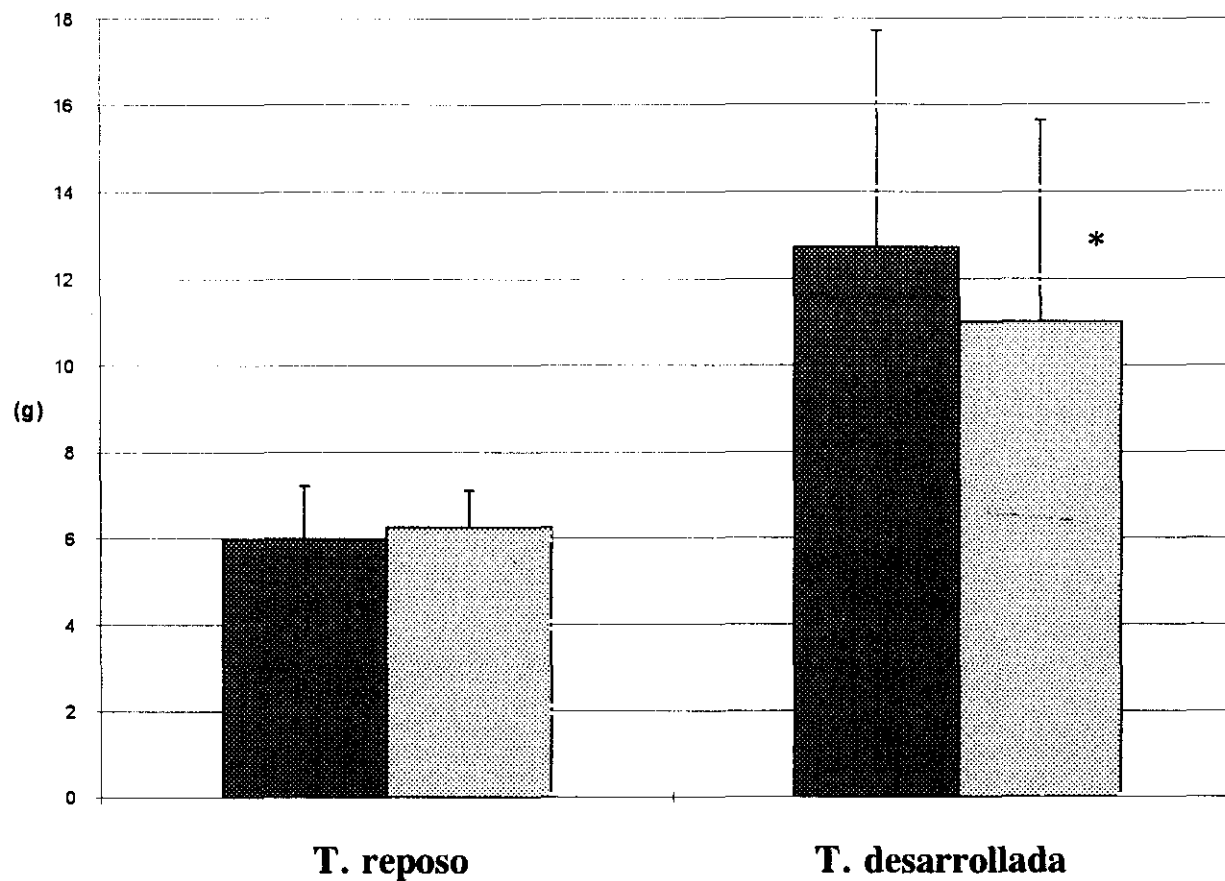


FIGURA 14.- Efectos del CPA 10^{-5} M sobre la tensión de reposo y la tensión desarrollada. Columna oscura: basal. Columna clara: tras 30 minutos con CPA 10^{-5} M. Los resultados se expresan como media + desviación típica (* = $p < 0,05$).

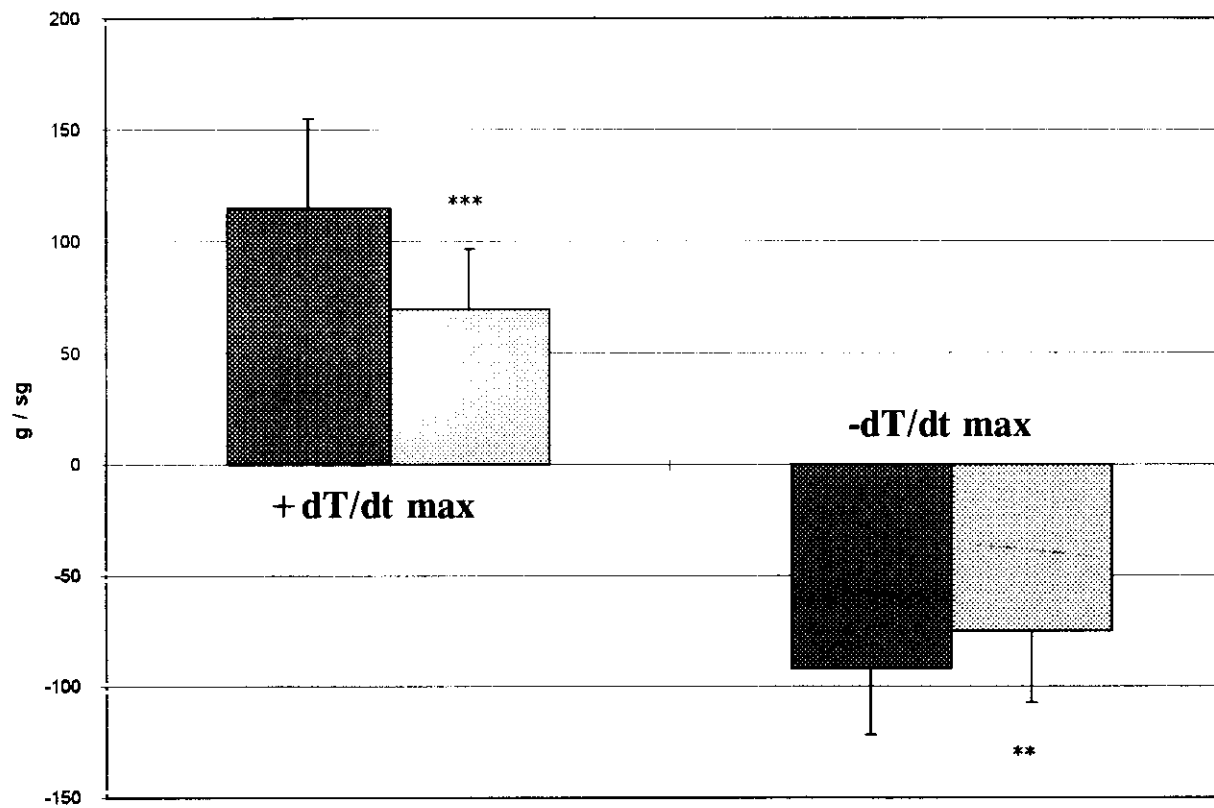


FIGURA 15.- Efectos del CPA 10^{-5} M sobre la máxima velocidad de contracción (+dT/dt max) y la máxima velocidad de relajación (-dT/dt max) (** = $p < 0,01$; * = $p < 0,001$).**

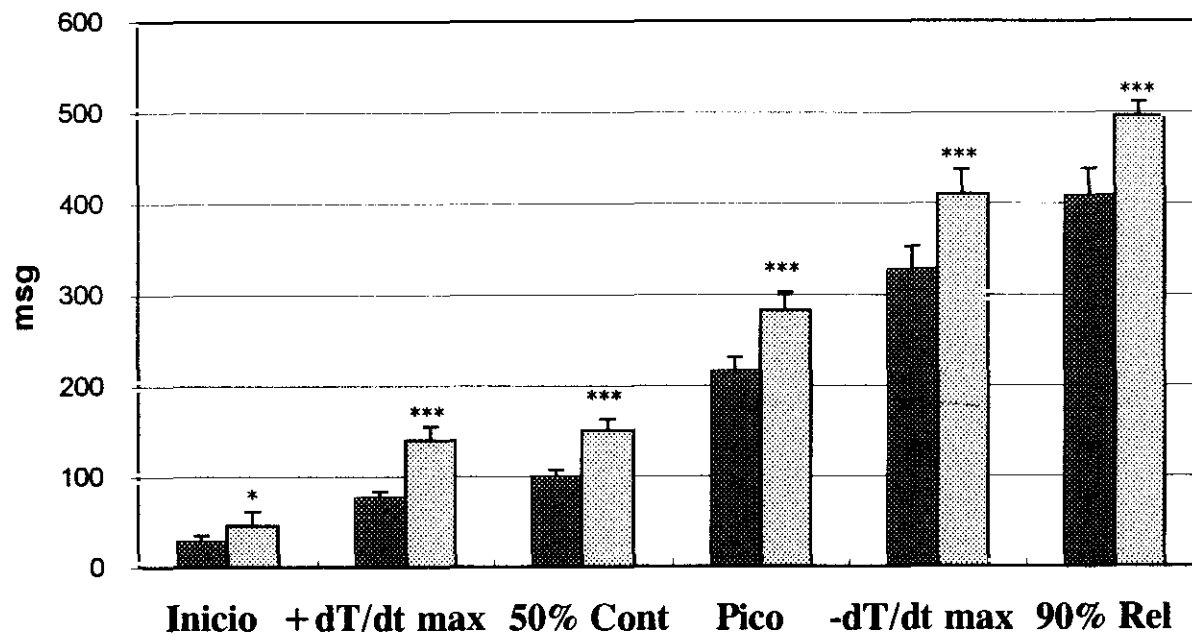


FIGURA 16.- Efecto del CPA 10^{-5} M sobre los tiempos de inicio de contracción, +dT/dt max, 50% de contracción, pico, -dT/dt max y 90% de relajación. Columna oscura: basal. Columna clara: tras 30 minutos con CPA 10^{-5} M. (* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$)

	T. REPOSO (g)	AMPLITUD (g)	+ dT / dt max (g/seg)	- dT /dt max (g/seg)
CONTROL				
BASAL	6,94 ± 1,91	13,26 ± 4,39	122,62 ± 38,66	-101,14 ± 36,82
FIN REPER	8,33 ± 1,86**	6,13 ± 2,13***	67,78 ± 21,15***	-49,73 ± 16,28***
CPA 10⁻⁶M (pre)				
BASAL	6,10 ± 1,10	16,85 ± 4,43	137,94 ± 41,08	-117,74 ± 33,10
CPA 10 ⁻⁶ M	5,70 ± 0,83	16,55 ± 4,25	130,57 ± 33,11	-113,97 ± 25,26
FIN REPER	6,40 ± 1,62	11,56 ± 3,88**	105,37 ± 38,39**	-86,01 ± 32,54**
CPA 10⁻⁵M (pre)				
BASAL	5,98 ± 1,25	12,72 ± 5,01	115,01 ± 39,72	-91,69 ± 30,02
CPA 10 ⁻⁵ M	6,25 ± 0,87	11,01 ± 4,63*	69,87 ± 26,67***	-75,02 ± 31,98**
FIN REPER	6,18 ± 1,57	6,97 ± 3,15***	70,15 ± 27,75***	-55,92 ± 25,72***
CPA 10⁻⁶M (pre + post)				
BASAL	6,66 ± 1,24	14,34 ± 5,22	133,33 ± 30,90	-105,64 ± 35,79
CPA 10 ⁻⁶ M	6,45 ± 0,23	13,57 ± 4,86	124,13 ± 28,30	-101,60 ± 26,42
FIN REPER	6,71 ± 0,15	9,22 ± 3,52**	92,70 ± 23,89*	-68,64 ± 24,13**
CPA 10⁻⁶M (post)				
BASAL	6,34 ± 0,96	13,33 ± 4,28	126,25 ± 33,20	-105,62 ± 31,52
FIN REPER	8,80 ± 0,75***	6,27 ± 2,57***	70,07 ± 23,15***	-55,71 ± 20,02***

TABLA 7.- Efecto de la isquemia-reperfusión y de la administración de CPA sobre los parámetros contráctiles en cada grupo experimental: Control (n=11) y CPA = ácido ciclopiazónico perfundido durante 30 minutos a las dosis indicadas en preisquemia (*pre*; n=8 para 10⁻⁶ M; n=9 para 10⁻⁵ M); en preisquemia y durante la reperfusión (*pre + post*; n=3) y sólo durante la reperfusión (*post*; n=4). Las comparaciones se realizan respecto a las medidas basales de cada grupo (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; * = $p < 0,001$).**

	INICIO (mseg)	+dT/dtmax (mseg)	50% CON (mseg)	PICO (mseg)	-dT/dtmax (mseg)	90% REL (mseg)
CONTROL						
BASAL	29,64±0,95	84,04±8,81	108,84±7,83	235,22±14,30	326,27±27,65	442,41±22,56
FIN REPER	30,94±1,01**	77,87±7,55**	96,67±8,87**	195,61±16,71***	283,34±25,04***	369,50±38,52***
CPA 10⁻⁶M (pre)						
BASAL	28,38±2,11	81,65±5,87	109,62±5,82	236,47±10,04	329,31±18,01	439,31±16,85
CPA 10 ⁻⁶ M	28,96±1,72	84,87±9,34	113,22±6,26	243,87±9,66	369,34±12,14*	484,34±15,37*
FIN REPER	31,54±2,47*	85,76±10,02	108,73±12,72	217,52±28,36	344,77±45,85	410,83±48,49
CPA 10⁻⁵M (pre)						
BASAL	29,60±5,11	77,54±6,19	104,73±6,07	217,21±14,24	328,87±24,10	419,32±28,86
CPA 10 ⁻⁵ M	45,99±15,29*	140,12±14,67***	150,56±12,11***	282,82±19,14***	409,87±27,27***	495,76±15,54***
FIN REPER	30,43±2,06	79,53±10,33	99,51±8,35	200,58±30,96	301,53±26,93**	379,43±36,89**
CPA 10⁻⁶M (pre + post)						
BASAL	26,81±3,75	80,51±4,51	108,32±5,05	236,84±15,22	338,07±19,46	433,76±18,71
CPA 10 ⁻⁶ M	27,75±2,77	87±7,02	114,26±3,26	253,83±9,97	377,74±14,14*	465,08±23,11*
FIN REPER	30,49±3,69	92,10±2,74	112,86±5,66	224,57±7,70	306,20±10,48*	413,44±12,20
CPA 10⁻⁶M (post)						
BASAL	29,66±1,21	82,72±5,83	106,22±6,30	228,12±16,66	325,35±20,48	436,37±19,77
FIN REPER	32,22±1,96***	79,96±3,76	97,12±5,61**	210,33±12,80**	296,15±18,62**	406,55±20,32**

TABLA 8.- Modificación de la cronología de la contracción media tras isquemia-reperfusión y tras la perfusión con CPA en los diversos grupos experimentales. Control (n = 11), CPA 10⁻⁶ M administrado durante 30 minutos en preischemia (pre; n = 8), CPA 10⁻⁵ M perfundido durante 30 minutos en preischemia (n = 9), CPA 10⁻⁶ M administrado en preischemia y durante la reperfusión (pre + post; n = 3), y CPA 10⁻⁶ M perfundido exclusivamente durante la reperfusión (post; n = 4). Las comparaciones se establecen siempre respecto a los valores basales de cada grupo (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

IV.3.- EFECTOS DE LA ISQUEMIA-REPERFUSION SOBRE PARAMETROS CONTRACTILES.

IV.3.1.- EFECTOS SOBRE LOS PARAMETROS CONTRACTILES DE LA ISQUEMIA DE 30 MINUTOS SEGUIDA DE 30 MINUTOS DE REPERFUSION.

En la tablas 7 y 8 se recogen las variaciones inducidas por la isquemia global de 30 minutos seguida de 30 minutos de reperfusión sobre la tensión de reposo, amplitud contráctil, $+dT/dt$ max, $-dT/dt$ max y tiempos de inicio de contracción, $+dT/dt$ max, 50% de contracción, pico, $-dT/dt$ max y 90% de relajación, en los diversos grupos experimentales. Las diferencias entre los valores basales registrados para los diferentes grupos experimentales no resultaron estadísticamente significativas en ningún caso.

- Experimentos control.

La isquemia-reperfusión control (n = 11) (Figura 17) produjo una elevación final de la tensión de reposo de un $21,04 \pm 5,06$ % respecto a la basal ($p < 0,01$): inicialmente se eleva de forma progresiva durante la isquemia con un incremento medio de $7,06 \pm 3,20$ g justo antes de la reperfusión, alcanzando los valores máximos a los 2 minutos de la misma ($10,11 \pm 4,25$ g). La amplitud contráctil se recuperó un $43,75 \pm 7,36$ % (Figura 18), la máxima velocidad de contracción descendió un $46,8 \pm 10,02$ % ($p < 0,001$) y la máxima velocidad de relajación un $52,13 \pm$

12,25 % ($p < 0,001$). El tiempo de inicio de contracción presentó una prolongación final del $7,01 \pm 2,21$ % ($p < 0,01$). El resto de medidas de tiempo sufrieron un acortamiento que resultó también estadísticamente significativo: tiempo para $+dT/dt$ max ($7,14 \pm 1,25$ %; $P < 0,01$), tiempo para el 50% de contracción ($11,06 \pm 2,31$ %; $p < 0,01$), tiempo para el pico de contracción ($17,43 \pm 4,04$ %; $p < 0,01$), tiempo para $-dT/dt$ max ($13,20 \pm 2,13$ %; $p < 0,001$) y tiempo para el 90% de relajación ($17,62 \pm 3,72$ %; $p < 0,01$) (Tablas 7 y 8).

- Experimentos con CPA 10^{-6} M en preisquemia.

En los experimentos realizados con CPA 10^{-6} M administrado durante los 30 minutos antes a iniciar la isquemia ($n = 8$) (Figura 19) la tensión de reposo final permanecía ligeramente elevada respecto al valor basal, pero de forma no estadísticamente significativa. Su elevación al final de la isquemia era de $2,15 \pm 1,18$ g por término medio, con un pico a los 2 minutos de reperusión de $3,40 \pm 1,86$ g. La amplitud contráctil se recuperó un $67,45 \pm 10,21$ % (Figura 18) por término medio. La caída del $+dT/dt$ max fue de un $24,50 \pm 6,22$ % ($p < 0,01$), y la del $-dT/dt$ max de un $27,52 \pm 6,43$ % ($p < 0,01$) (Tabla 7).

En cuanto a los tiempos, tras la reperusión todos los valores registrados alcanzaron cifras semejantes a las basales, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas salvo para el tiempo de inicio de la contracción, que presentó una prolongación media del $9,6 \pm 3,02$ % ($p < 0,05$) (Tabla 8).

- Experimentos con CPA 10^{-5} M en preisquemia.

Los experimentos realizados con CPA 10^{-5} M perfundido durante los 30 minutos anteriores al inicio de la isquemia ($n = 9$) tampoco presentaron diferencias significativas en la tensión de reposo final. Durante la isquemia presentó la menor elevación de todos los grupos ($1,95 \pm 0,78$ g), con un pico de $2,41 \pm 1,24$ g a los 2 minutos de la reperusión. La amplitud contráctil se recuperó un $52,53 \pm 9,01$ % (Figura 18). La máxima velocidad de contracción descendió un $39,12 \pm 4,33$ % ($p < 0,001$), y la máxima velocidad de relajación un $41,02 \pm 4,82$ % ($p < 0,001$) (Tabla 7).

Los tiempos medios de la contracción final resultaron semejantes a los basales, salvo el tiempo para el $-dT/dt$ max que resultó un $8,31 \pm 0,39$ % ($p < 0,01$) inferior al basal, y el tiempo para el 90% de relajación que permanecía un $7,22 \pm 0,51$ % ($p < 0,05$) por debajo del valor inicial (Tabla 8).

- Experimentos con CPA 10^{-6} M administrado en presisquemia y durante la reperusión.

En este grupo ($n = 3$), el comportamiento resultó semejante al obtenido con la misma dosis administrada sólo durante la preisquemia. La tensión de reposo no presentaba diferencias significativas con la basal. La amplitud contráctil se recuperó un $63,29 \pm 2,15$ %. El $+dT/dt$ max cayó un $30,83 \pm 8,28$ % ($p < 0,05$), y el $-dT/dt$ max un $35,24 \pm 6,12$ % ($p < 0,01$) (Tabla 7).

En los tiempos de contracción la única variación significativa tras la reperfusión correspondió a una disminución del tiempo para el $-dT/dt$ max del $9,87 \pm 1,02$ % ($p < 0,05$) (Tabla 8).

- Experimentos con CPA 10^{-6} M administrado sólo durante la reperfusión.

Los resultados obtenidos en este grupo ($n = 4$) se aproximan a los obtenidos en el grupo control. La tensión de reposo tras la reperfusión resultó ser la más elevada de todos los grupos experimentales, tanto en valor absoluto como porcentual respecto a la basal, con una elevación media del $28,15 \pm 2,69$ % ($p < 0,001$). La amplitud de contracción se recuperó un $47,04 \pm 2,84$ % (Figura 18). La máxima velocidad de contracción bajó un $44,44 \pm 10,96$ % ($p < 0,001$) y el $-dT/dt$ max un $45,94 \pm 11,69$ % ($p < 0,001$) (Tabla 7).

El tiempo de inicio de la contracción quedó prolongado un $9,37 \pm 1,16$ % ($p < 0,001$). Los tiempos para el $+dT/dt$ max y 50% de contracción no presentaban diferencias significativas con los basales respectivos. El tiempo para el pico se acortó finalmente un $7,89 \pm 2,66$ % ($p < 0,01$). Los tiempos para el $-dT/dt$ max y 90% de relajación también se acortaron significativamente: $9,11 \pm 2,27$ % ($p < 0,01$) y $7,22 \pm 1,68$ % ($p < 0,01$) (Tabla 8).

- Otros experimentos.

Los resultados obtenidos en los dos casos donde se administró DMSO antes de la isquemia son superponibles a los del grupo de isquemia control, con un porcentaje de recuperación del $39,27 \pm 3,15 \%$.

En los dos experimentos donde se perfundió CPA 3×10^{-5} M la recuperación fue del $50,29 \pm 2,08 \%$. El resto de parámetros registraba modificaciones semejantes o ligeramente mayores a las obtenidas con CPA 10^{-5} M.

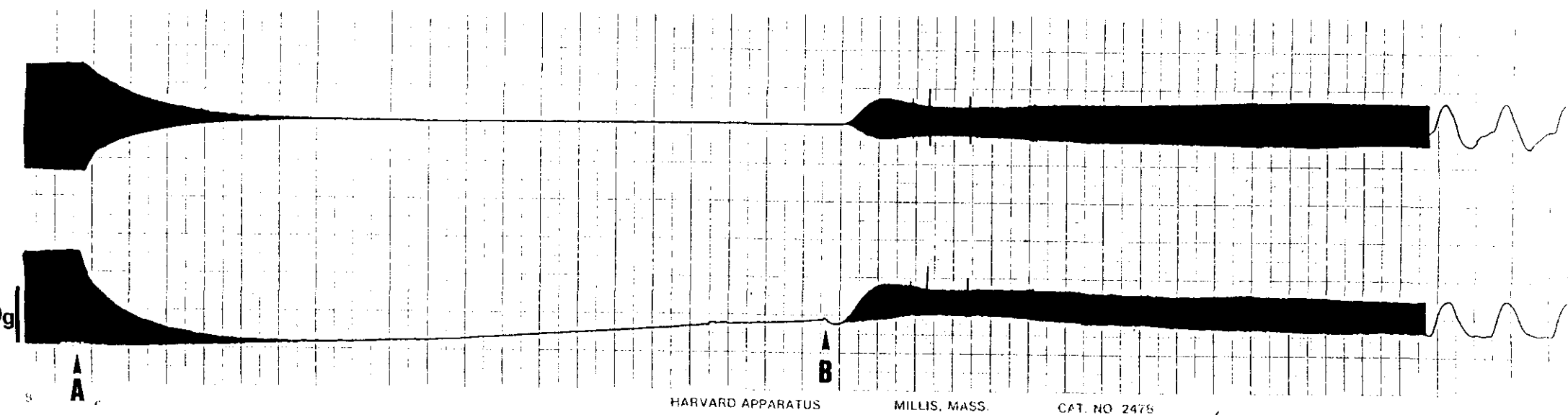


FIGURA 17.- Ejemplo de isquemia control de 30 minutos seguida de 30 minutos de perfusión en registro gráfico continuo. Las flechas indican el inicio de la isquemia (A) y de la perfusión (B). Trazado superior : dT/dt max. Trazado inferior: amplitud contractil. Tres cuadrados grandes verticales (15mm en el tamaño real) equivalen a 10 g de tensión. La tensión de reposo se elevó de forma característica durante la isquemia. El porcentaje de recuperación fue de un 32%.

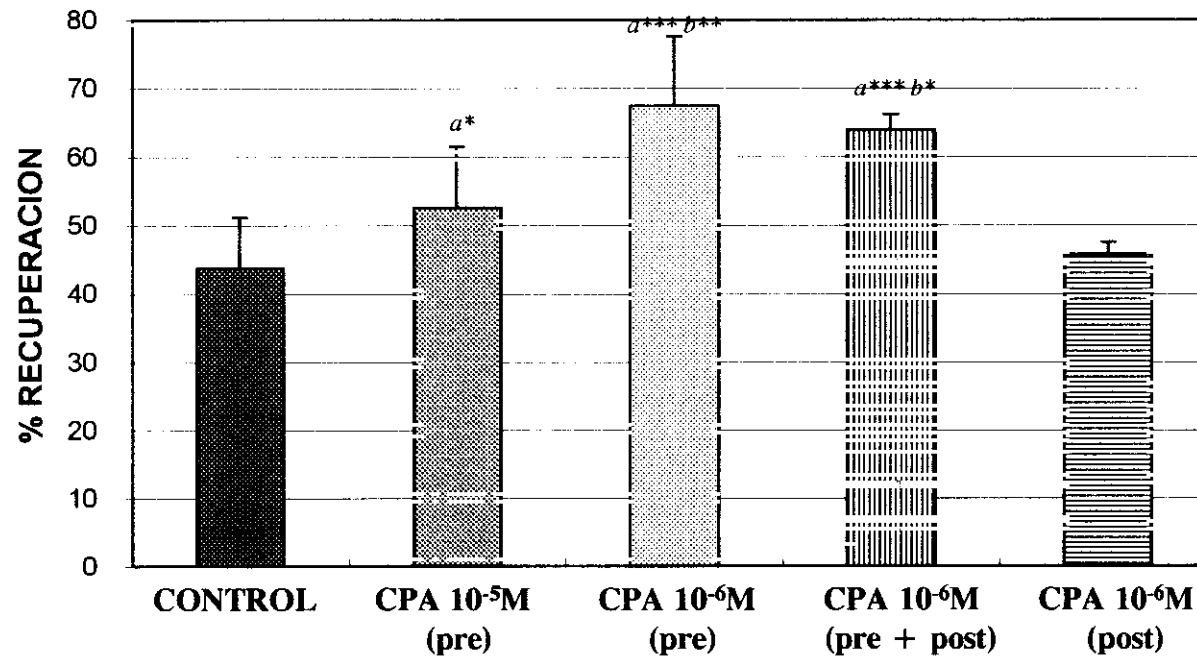


FIGURA 18.- Porcentajes de recuperación de la amplitud de contracción respecto a valores basales tras 30 isquemia y reperusión. Columna más oscura: isquemia control (n = 11); columna intermedia: grupo bajo tratamiento con CPA 10⁻⁵M durante 30 minutos en preisquemia (n = 9); columna más clara: grupo bajo tratamiento con CPA 10⁻⁶M durante 30 minutos en preisquemia (n = 8); columna con rayado vertical: grupo bajo tratamiento con CPA 10⁻⁶M durante 30 minutos en preisquemia y durante la reperusión (n = 4); columna con rayado horizontal: grupo bajo tratamiento con CPA 10⁻⁶M sólo durante la reperusión (n = 4). (*a* = grupo tratado vs control, *b* = grupo tratado vs grupo CPA 10⁻⁵M, * = *p* < 0,05; ** = *p* < 0,01; *** = *p* < 0,001).

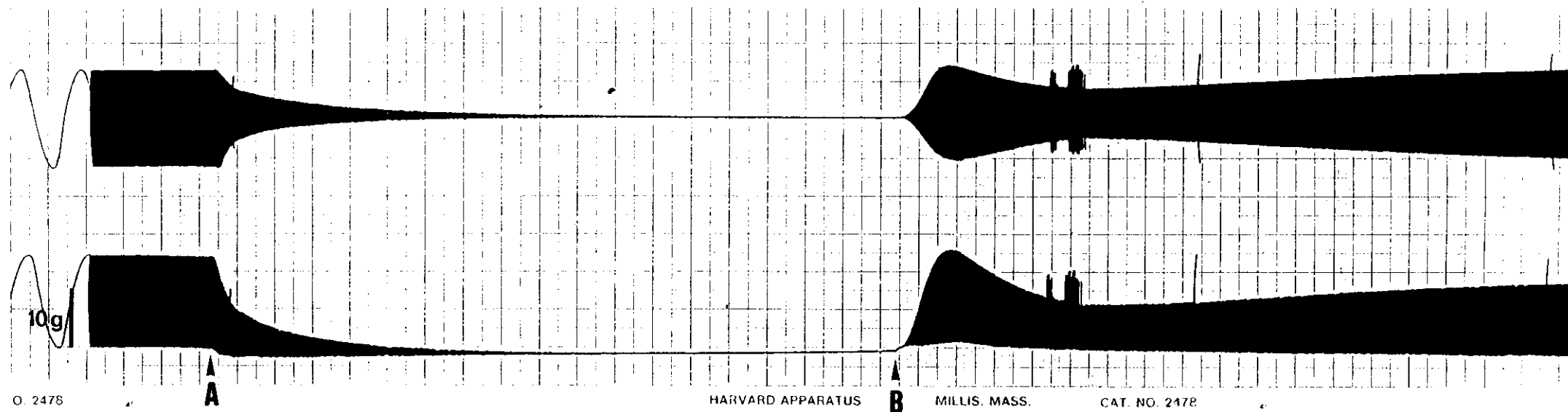


FIGURA 19.- Ejemplo de isquemia de 30 minutos seguida de 30 minutos de perfusión en un septum pretratado con CPA 10^{-6} M. Las flechas indican el inicio de la isquemia (A) y de la perfusión (B). Trazado superior : dT/dt max. Trazado inferior: amplitud contractil. Tres cuadrados grandes verticales (15mm en el tamaño real) equivalen a 10 g de tensión. La tensión de reposo no se elevó durante la isquemia. El porcentaje de recuperación fue de un 76%.

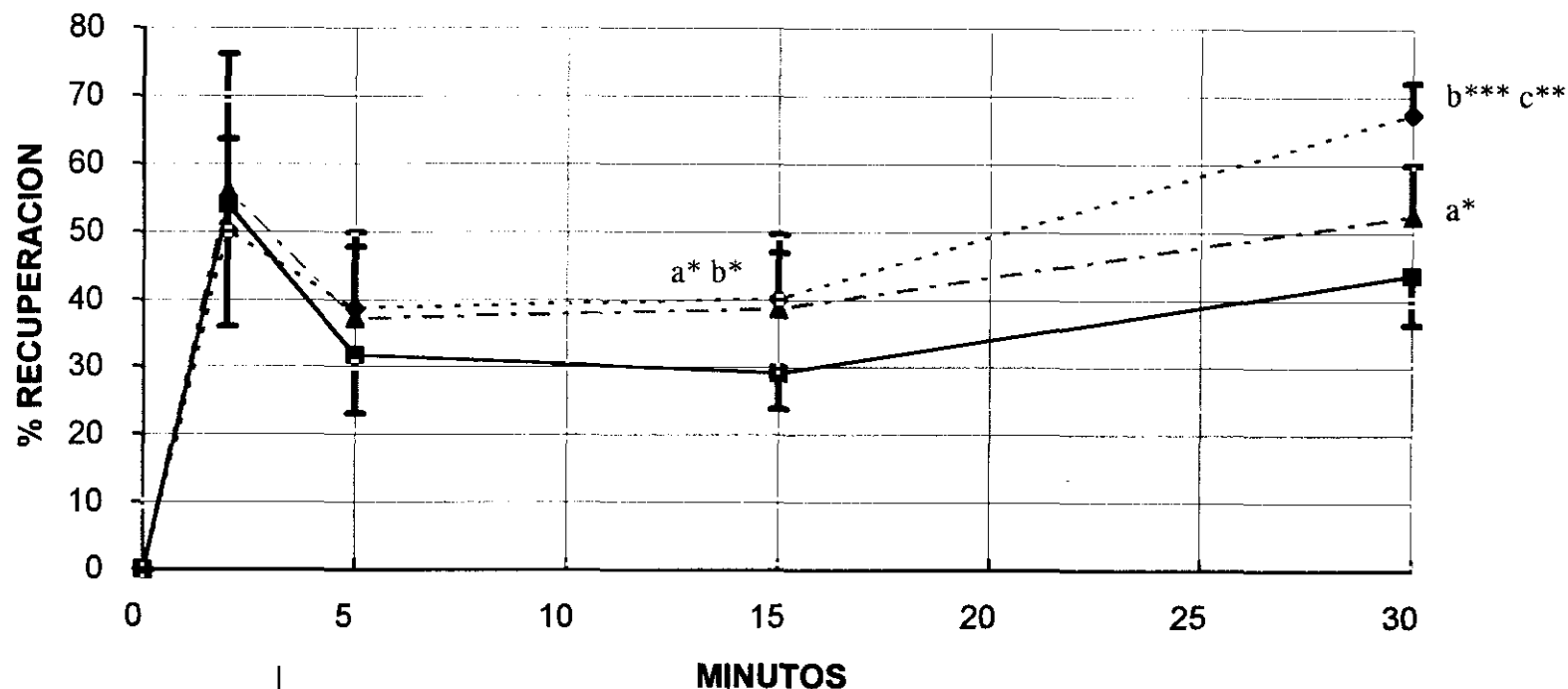


FIGURA 20.- Porcentaje de recuperación de la amplitud contráctil durante la reperfusion tras isquemia de 30 minutos en el grupo control (línea continua, n =11), grupo bajo tratamiento con CPA 10⁻⁵ M (línea de puntos y rayas, n =9) durante 30 minutos antes de la isquemia, y grupo bajo tratamiento con CPA 10⁻⁶ M (línea de puntos, n =8) durante 30 minutos antes de la isquemia. Las medidas se realizaron a los 2, 5, 15 y 30 minutos de reperfusion (*a* = CPA 10⁻⁵M vs control; *b* = CPA 10⁻⁶M vs control; *c* = CPA 10⁻⁶M vs CPA 10⁻⁵M ; * = *p* < 0.05; ** = *p* < 0,01; *** = *p* < 0,001).

En la figura 18 se representa un histograma con los porcentajes de recuperación de la amplitud contráctil respecto a valores basales en los diversos grupos experimentales descritos. El máximo porcentaje de recuperación corresponde al grupo tratado con CPA 10^{-6} M en la preisquemia ($67,45 \pm 10,21$ %) con una diferencia muy significativa ($p < 0,001$) respecto al grupo de isquemia control. La recuperación con CPA 10^{-5} M en preisquemia ($52,53 \pm 9,01$ %) también ofrece una diferencia estadísticamente significativa respecto a la isquemia control ($p < 0,05$), y a su vez, respecto al grupo de CPA 10^{-6} M en preisquemia ($p < 0,01$).

El grupo tratado con CPA 10^{-6} M tanto en preisquemia como durante la reperusión recupera un $63,29 \pm 2,15$ %, con lo que no se distingue estadísticamente de los resultados obtenidos administrando el fármaco a la misma dosis sólo en preisquemia, pero sí que presenta diferencias significativas con el grupo de CPA 10^{-5} M ($p < 0,05$) y, por supuesto, con el grupo control ($p < 0,001$).

El grupo en que se perfundía el CPA 10^{-6} M exclusivamente en la reperusión obtiene un resultado comparable al de la isquemia control, con una recuperación del $47,04 \pm 2,84$ %.

En la figura 20 se recoge la evolución de la recuperación de la contracción a lo largo de la reperusión en los grupos control, CPA 10^{-5} y CPA 10^{-6} M administrados en preisquemia. Las diferencias entre los dos

grupos tratados y el control empiezan a ser estadísticamente significativas a partir de los 15 minutos.

IV.3.2.-CARACTERISTICAS CINETICAS DE LA MODIFICACION DE LOS PARAMETROS CONTRACTILES INDUCIDA POR LA ISQUEMIA.

Se analizaron las modificaciones de diversos parámetros de contractilidad durante los 10 primeros minutos de isquemia global en los grupos de isquemia control (n = 10), bajo tratamiento con CPA 10^{-6} M en preisquemia (n = 9), y pretratado con CPA 10^{-5} M (n = 8).

La amplitud de contracción, $+dT/dt$, $-dT/dt$, tiempo para pico y tiempo para 90% de relajación pudieron ajustarse a funciones mono o biexponenciales, según los casos, en función de las pendientes de caída obtenidas a través de la representación semilogarítmica de la evolución de dichos parámetros durante los 10 minutos iniciales de la isquemia.

La ecuación genérica que rige dichas funciones exponenciales sería del tipo:

$$y = y_0 e^{-t/\tau}$$

Donde y_0 es la ordenada en el origen, t es el tiempo de isquemia transcurrido expresado en minutos, y τ la constante de tiempo que rige el proceso (inversamente proporcional a la velocidad del proceso).

La caída de la **amplitud contráctil** en el grupo control sigue un modelo biexponencial, con una fase rápida inicial de pendiente media $\tau=0,43$ min, con un coeficiente de determinación medio (r^2) superior a 0,98, seguida de una fase lenta con $\tau=2,74$ min ($r^2=0,99$). La fase rápida inicial viene precedida de un pequeño decalaje de 9,94 sg por término medio, tiempo durante el cual la amplitud tiene un comportamiento poco homogéneo y difícil de caracterizar, en el que suele elevarse ligeramente antes de iniciar el descenso rápido descrito. En el grupo tratado con CPA 10^{-5} M la pendiente de la fase rápida es significativamente mayor respecto al control ($\tau=0,27$ min; $r^2=0,97$; $p<0,05$) y le sigue un fase lenta semejante al control ($\tau=2,64$ min; $r^2=0,99$). Sin embargo, en el grupo tratado con CPA 10^{-6} M no se aprecia esta fase rápida, de forma que la caída de la amplitud puede ajustarse a una función monoexponencial ($\tau=3,24$ min; $r^2=0,99$). El comportamiento de la tensión desarrollada expresada en gramos en cada ciclo contráctil durante los primeros minutos de la isquemia quedaría definida, en función del tiempo (min), por las siguientes funciones (Figura 21; tabla 9):

	fase rápida	fase lenta
Control:	$y = 2,65 e^{-(t-10)/0,43} + 10,44 e^{-t/2,74}$	
CPA 10^{-6} M:	$y =$	$15,16 e^{-t/3,24}$
CPA 10^{-5} M:	$y = 2,63 e^{-t/0,27} + 8,01 e^{-t/2,64}$	

El $+dT/dt$ max en la isquemia control tiene un comportamiento característico. Tras una meseta inicial de unos 50 sg ($49,95 \pm 21,85$ sg)

en la que permanece estable, inicia una caída que se ajusta con enorme precisión a una función monoexponencial ($\tau=2,29$ min; $r^2 > 0,99$). En el grupo pretratado con CPA 10^{-6} M el comportamiento es semejante, pero la meseta inicial es significativamente más prolongada ($85,83 \pm 20,02$; $p < 0,05$), y la caída posterior también se ajusta a una función monoexponencial, aunque con menor velocidad de caída ($\tau=2,78$ min; $r^2 > 0,99$). En los casos bajo tratamiento con CPA 10^{-5} M el comportamiento es bien distinto, distinguiéndose una fase rápida inicial ($\tau=0,45$ min; $r^2=0,95$) seguida de otra más lenta ($\tau=2,98$; $r^2=0,98$), sin observarse meseta inicial en ningún caso. El comportamiento del $+dT/dt$ max expresado en g/sg durante los minutos iniciales de la isquemia quedaría definido, en función del tiempo (min), por las siguientes funciones (Figura 22; tabla 9) :

Control:	$y = 115,18 e^{-(t-50)/2,29}$
CPA 10^{-6} M	$y = 159,14 e^{-(t-86)/2,78}$
CPA 10^{-5} M	$y = 31,81 e^{-t/0,45} + 56,16 e^{-t/2,98}$

El $-dT/dt$ max puede ajustarse en todos los casos a funciones biexponenciales precedidas de un ligero retraso inicial bastante homogéneo en todos los grupos y significativamente menor del encontrado en el $+dT/dt$ max. Dicho retraso no es exactamente una meseta, sino que tiende a reflejar un ligero aumento inicial (difícilmente caracterizable) antes de iniciar el descenso característico. Así, en el grupo control el retraso es de $20,4 \pm 14,3$ sg, la pendiente de la fase rápida es la de

mayor velocidad de caída ($\tau=0,37$; $r^2=0,98$), y lo mismo ocurre en la fase lenta ($\tau=2,44$; $r^2=0,99$). En el grupo bajo tratamiento con CPA 10^{-6} M el retraso fue de $19 \pm 5,67$ sg, y las pendientes de caída las más lentas de los tres grupos: fase rápida ($\tau=0,66$; $r^2=0,98$; $p < 0,05$, respecto al control) y fase lenta ($\tau=3,70$; $r^2 > 0,99$; $p < 0,05$, respecto al control). Los resultados obtenidos con CPA 10^{-5} M son intermedios, con un retraso de $15,9 \pm 9,23$ sg, fase rápida ($\tau=0,42$; $r^2=0,97$) y fase lenta ($\tau=2,78$; $r^2=0,99$). El comportamiento del $-dT/dt$ max expresado en g/sg durante los minutos iniciales de la isquemia puede caracterizarse, en función del tiempo (min), de acuerdo con las siguientes funciones (Figura 23; tabla 9):

Control	$y = 25,08 e^{-(t-20)/0,37} + 70,24 e^{-t/2,44}$
CPA 10^{-6} M	$y = 38,16 e^{-(t-19)/0,66} + 68,85 e^{-t/3,70}$
CPA 10^{-5} M	$y = 31,88 e^{-(t-16)/0,42} + 43,46 e^{-t/2,78}$

El acortamiento del tiempo para el pico durante los primeros momentos de la isquemia sigue un comportamiento monoexponencial en todos los casos. En el grupo control este acortamiento es ligeramente más rápido ($\tau=0,60$ min; $r^2=0,97$), aunque no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en ningún caso. En el grupo de CPA 10^{-6} M y CPA 10^{-5} M las constantes son muy semejantes: $\tau=0,66$ ($r^2=0,97$) y $\tau=0,69$ ($r^2=0,95$), respectivamente. El acortamiento del tiempo para el pico de contracción expresado en msg durante los primeros momentos de la isquemia se define, en función del tiempo (min), para cada grupo con

las siguientes funciones (Figura 24; tabla 9):

Control:	$y = 86,59 e^{-t/0,60}$
CPA 10^{-6} M	$y = 100,12 e^{-t/0,66}$
CPA 10^{-5} M	$y = 71,36 e^{-t/0,69}$

El acortamiento del tiempo para el 90% de relajación sigue también un comportamiento bastante homogéneo en los diversos grupos de experimentación. La isquemia control presenta la menor velocidad de acortamiento ($\tau=0,48$ min; $r^2=0,97$), seguida del grupo tratado con CPA 10^{-5} M ($\tau=0,43$; $r^2=0,93$). El grupo al que se administró CPA 10^{-6} M exhibe el ritmo de acortamiento más rápido ($\tau=0,36$; $r^2=0,96$). Las funciones que caracterizan este proceso serían las siguientes (Figura 25; tabla 9):

Control:	$y = 119 e^{-t/0,48}$
CPA 10^{-6} M	$y = 97,52 e^{-t/0,36}$
CPA 10^{-5} M	$y = 87,75 e^{-t/0,43}$

	CONTROL (n = 10)	CPA 10 ⁻⁶ M (n = 9)	CPA 10 ⁻⁵ M (n = 8)
AMPLITUD F. Rápida	0,43 ± 0,15	No	0,27 ± 0,08*
AMPLITUD F. Lenta	2,74 ± 0,81	3,24 ± 0,82	2,64 ± 0,43
+dT/dt max F. Rápida	No	No	0,45 ± 0,07
+dT/dt max F. Lenta	2,29 ± 0,78	2,78 ± 0,31	2,98 ± 1,14
-dT/dt max F. Rápida	0,37 ± 0,13	0,66 ± 0,25*	0,42 ± 0,12
-dT/dt max F. Lenta	2,44 ± 1,13	3,70 ± 0,55*	2,78 ± 1,16
T. PICO	0,60 ± 0,32	0,66 ± 0,14	0,69 ± 0,16
T.90 % RELAJACION	0,48 ± 0,28	0,36 ± 0,15	0,43 ± 0,24

TABLA 9.- Constantes de tiempo de caída de los parámetros contráctiles ajustables a funciones mono o biexponenciales durante los 10 primeros minutos de isquemia. El acortamiento del tiempo para el pico y para el 90% de relajación están ajustados sólo respecto a los 3 y 2 minutos iniciales aproximadamente, momento en el que el acortamiento se hace casi cero. Las constantes de tiempo se expresan en min. * = $p < 0,05$, respecto al control.

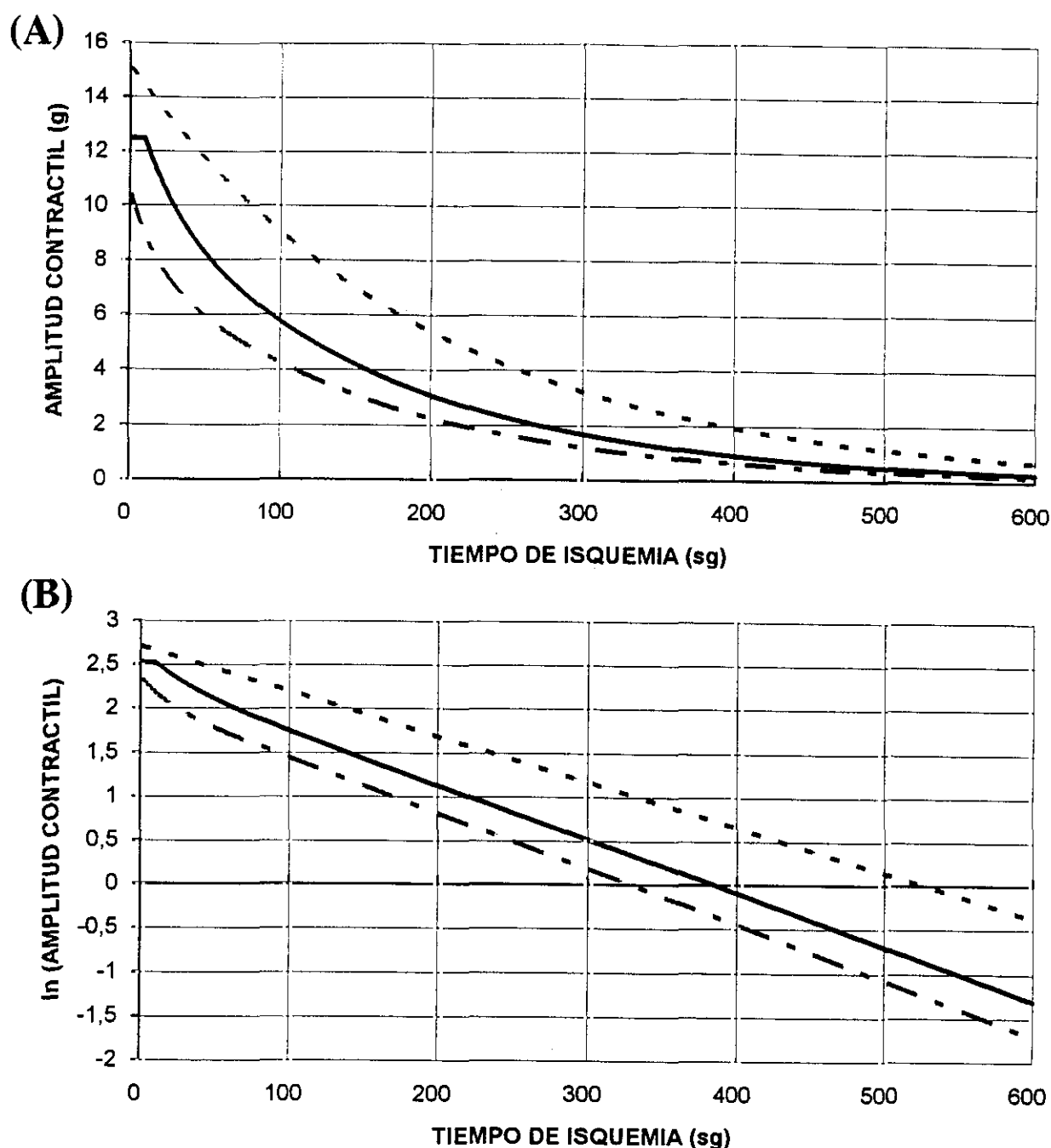


FIGURA 21.- Representación de la caída de la amplitud de contracción durante los 10 primeros minutos de ischemia en función de las constantes de tiempo medio de caída obtenidas para cada grupo y su ajuste a funciones mono- o biexponenciales. (A) Curvas de caída en valores absolutos. (B) Representación semilogarítmica que permite apreciar las diferentes pendientes de caída en cada proceso. Línea continua: grupo control (n=10); línea de puntos: bajo tratamiento con CPA 10^{-6} M (n=9); línea de puntos y rayas: bajo tratamiento con CPA 10^{-5} M (n=8).

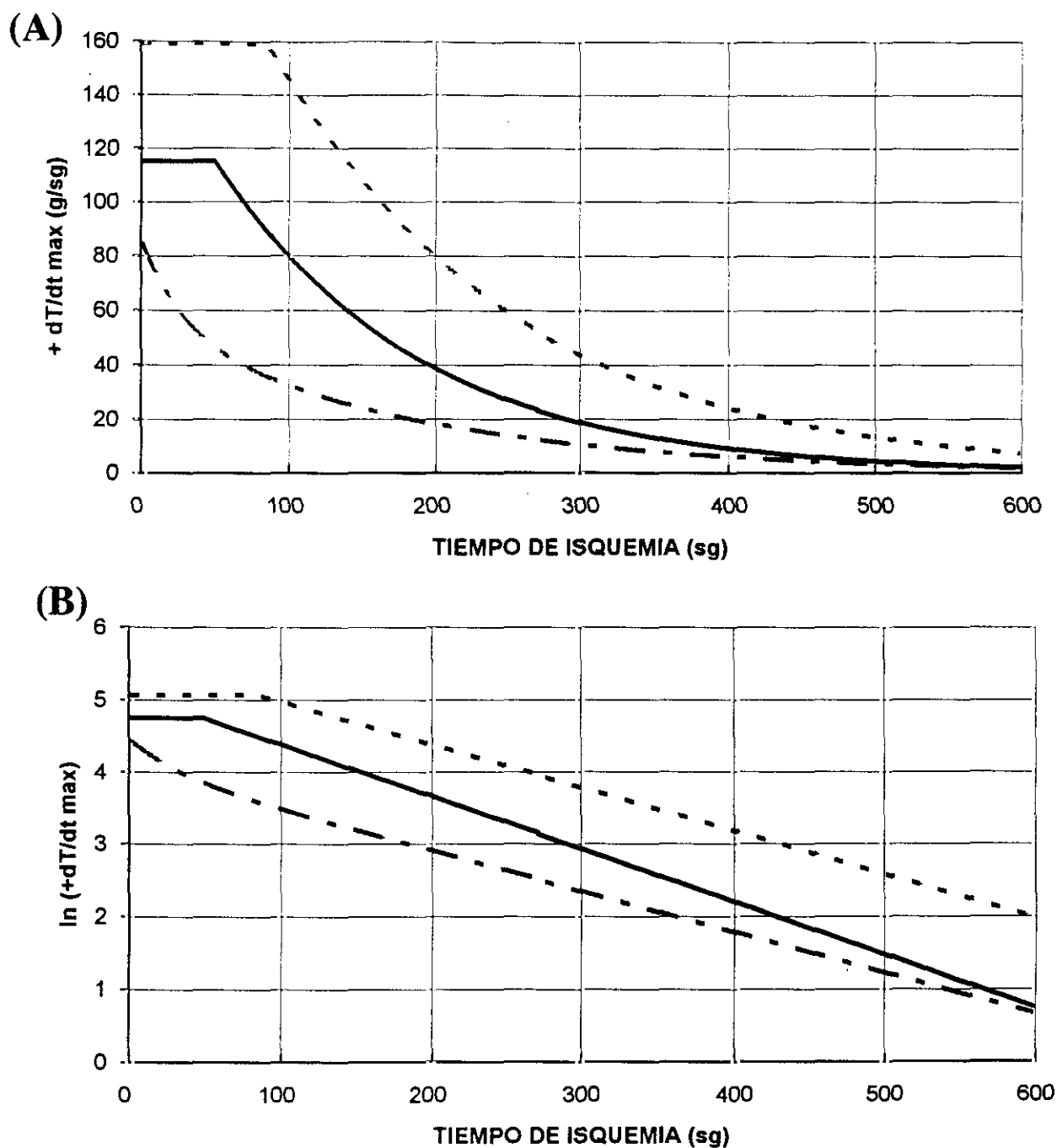


FIGURA 22.- Representación de la caída del $+dT/dt$ max durante los 10 primeros minutos de isquemia. El grupo tratado con CPA 10^{-6} M ($n=9$; línea de puntos) presenta una prolongación significativa de la característica meseta inicial presente en la isquemia control ($n=10$; línea continua). Llama la atención la ausencia de este decaimiento en el grupo tratado con CPA 10^{-5} M. (A) Curvas de caída en valores absolutos. (B) Representación semilogarítmica del mismo proceso.

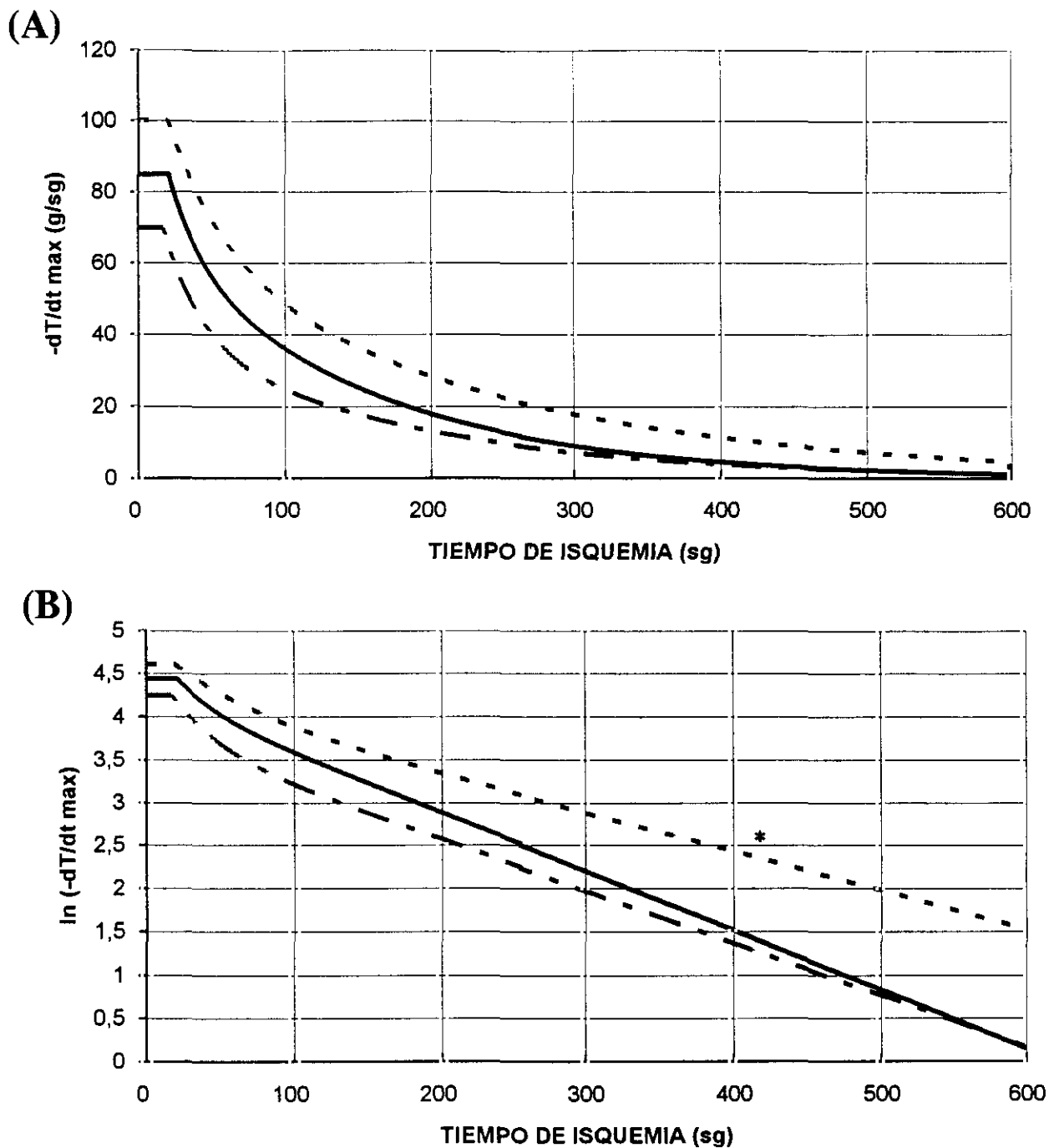
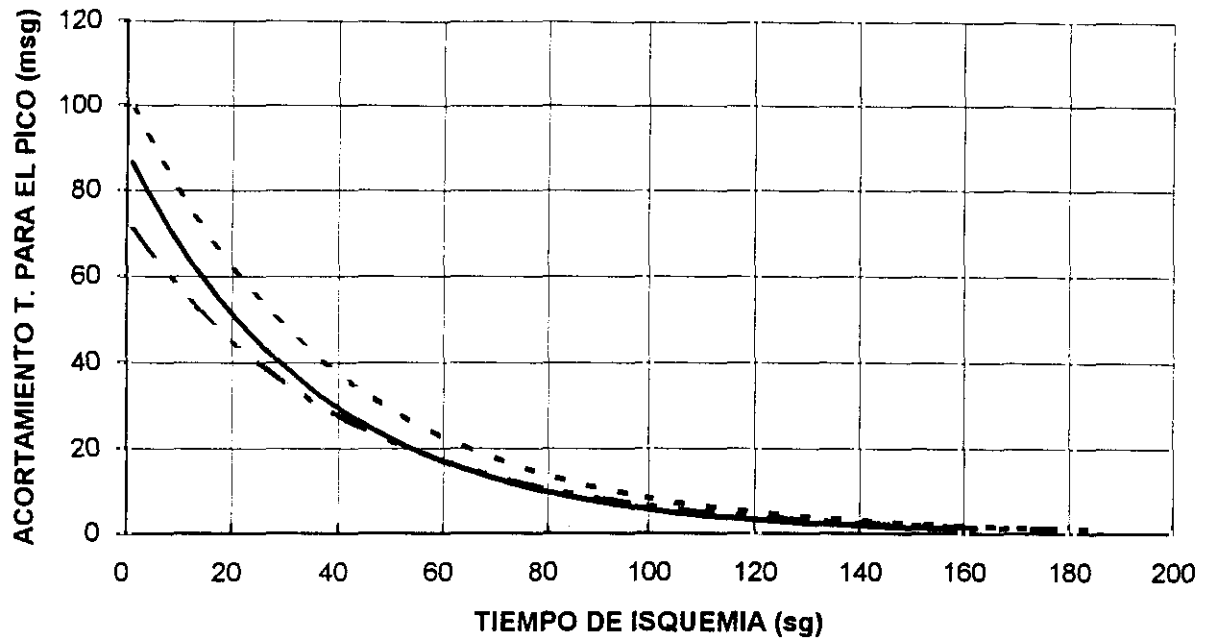


FIGURA 23.- Representación del comportamiento del $-dT/dt \text{ max}$ durante el inicio de la isquemia. Tras un pequeño decalaje inicial común, se inicia una caída ajustable a funciones biexponenciales en todos los grupos. (A) Curvas en valores absolutos. (B) Representación semilogarítmica. Las pendientes de caída del grupo bajo tratamiento con CPA 10^{-6} M son significativamente menores que las del grupo control (* = $p < 0,05$). Línea continua: grupo control ($n=10$); línea de puntos: CPA 10^{-6} M ($n=9$); línea de puntos y rayas: CPA 10^{-5} M ($n=8$).

(A)



(B)

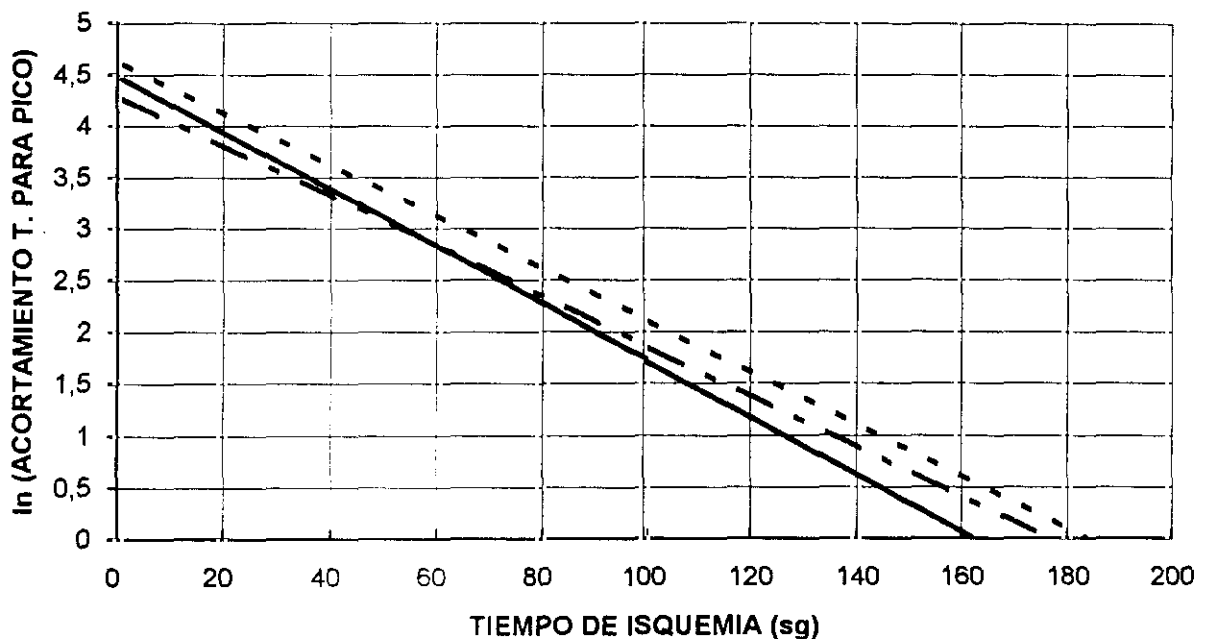


FIGURA 24.- Acortamiento del tiempo para el pico de contracción durante las fases iniciales de la isquemia. En menos de 3 minutos se hace casi cero. (A) Curvas en valores absolutos. (B) Representación semilogarítmica de las funciones monoexponenciales que caracterizan este proceso. Línea continua: control (n=10); línea de puntos: CPA 10^{-6} M (n=9); línea de puntos y rayas: CPA 10^{-5} M (n=8).

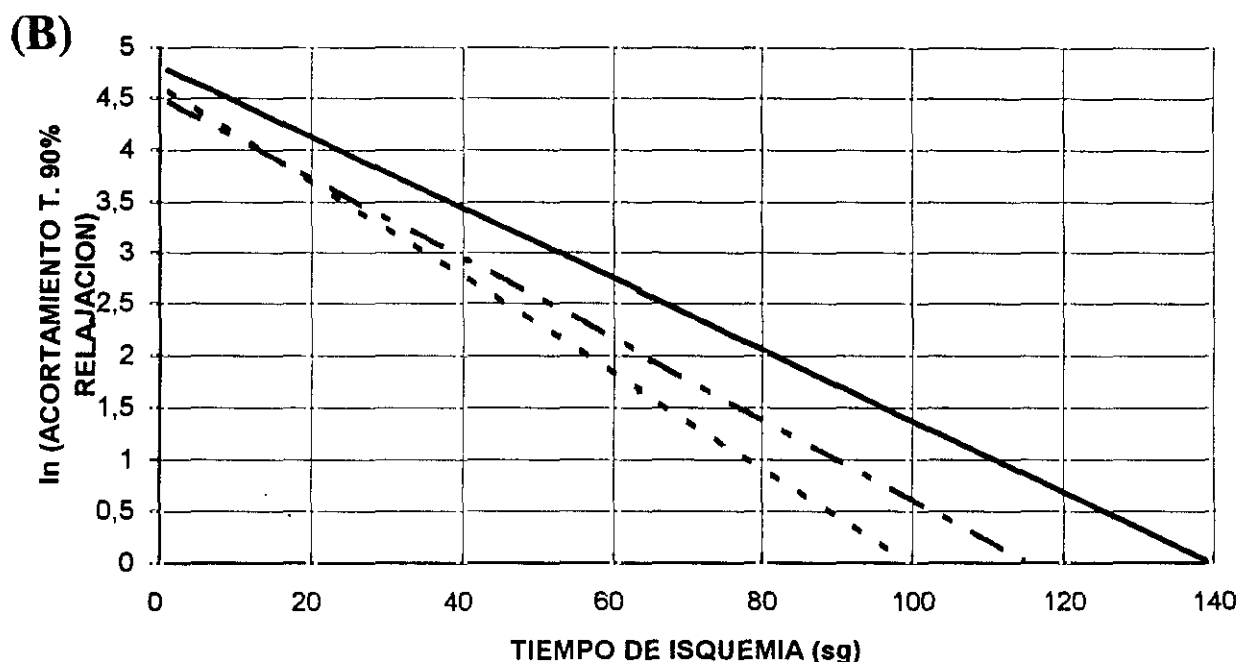
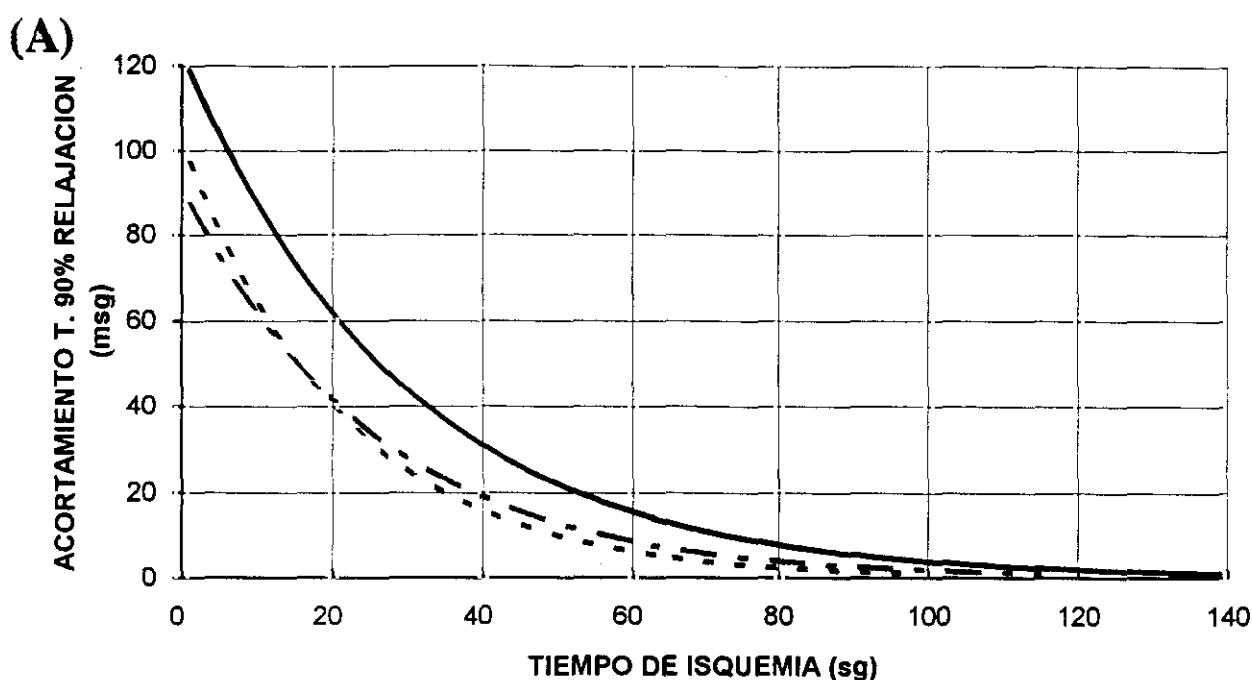


FIGURA 25.- Acortamiento del tiempo para el 90% de relajación desde el inicio de la isquemia. Entorno a los 2 minutos se hace cero. (A) Curvas en valores absolutos. (B) Representación semilogarítmica de las funciones monoexponenciales que definen este proceso. Línea continua: control (n=10); línea de puntos: CPA 10^{-6} M (n=9); Línea de puntos y rayas: CPA 10^{-5} M (n=8).

IV.4.- EFECTOS DE LA ISQUEMIA-REPERFUSION SOBRE PARAMETROS BIOQUIMICOS.

En la figura 26 se recoge la evolución de los niveles de creatin-fosfokinasa registrada en el líquido efluente recogido en condiciones basales antes de la isquemia y en distintos intervalos de la reperfusión. Los niveles basales en el grupo control (n = 8) y en el tratado con CPA 10^{-6} M (n = 6) no presentaban diferencias significativas. En el intervalo 0-2' los niveles de CPK obtenidos en el grupo bajo tratamiento eran un $67,65 \pm 34,28$ % (p < 0,01) menores a los registrados en el grupo control, entre los 5-7' era un $71,4 \pm 23,69$ % (p < 0,05) menor, en los 13-15' era del $78,12 \pm 29,24$ % (p < 0,01), y en el 28-30' del $86,74 \pm 36,71$ % (p < 0,05).

En la figura 27 aparece la misma evolución en el tiempo de los niveles de la aspartato-aminotransferasa (ASAT/GOT). Los valores basales son homogéneos. En el intervalo 0-2' el descenso en el grupo tratado fue de $46,60 \pm 18,25$ % (p < 0,01); entre los 5-7' un $29,88 \pm 5,72$ % (p < 0,05); en los 13-15' un $36,84 \pm 12,96$ %, y entre los 28-30' un $43,86 \pm 19,57$ % (p < 0,05).

La figura 28 recoge la evolución de los niveles de lactato-dehidrogenasa (LDH) en los grupos e intervalos ya descritos. Los niveles basales resultaron homogéneos. En el primer intervalo descendió el nivel de LDH un $36,87 \pm 14,12$ % (p < 0,05) en el grupo tratado respecto al de

isquemia control; entre los 5-7' un $37,84 \pm 10,77 \%$ ($p < 0,05$); en los 13-15' un $42,44 \pm 12,86 \%$ ($p < 0,05$), y a los 28-30' un $50,14 \pm 15,66 \%$ ($p < 0,05$).

En los registros de CPK y GOT, en los dos últimos intervalos de recogida de enzimas, las diferencias en el grupo control y el tratado respecto a las cifras basales obtenidas en sus respectivos grupos no fueron estadísticamente significativos.

Las enzimas recogidas en los experimentos con CPA 10^{-6} M administrado en la preischemia y durante la reperfusión ($n=3$) no presentaron diferencias estadísticamente significativas para cada intervalo respecto a las obtenidas en el grupo de CPA 10^{-6} M administrado exclusivamente antes de la isquemia.

Por otra parte, los resultados de las enzimas recogidas en los experimentos realizados administrando CPA 10^{-6} M sólo en la reperfusión tampoco presentan diferencias estadísticamente significativas comparadas, intervalo a intervalo, con las del grupo de isquemia control.

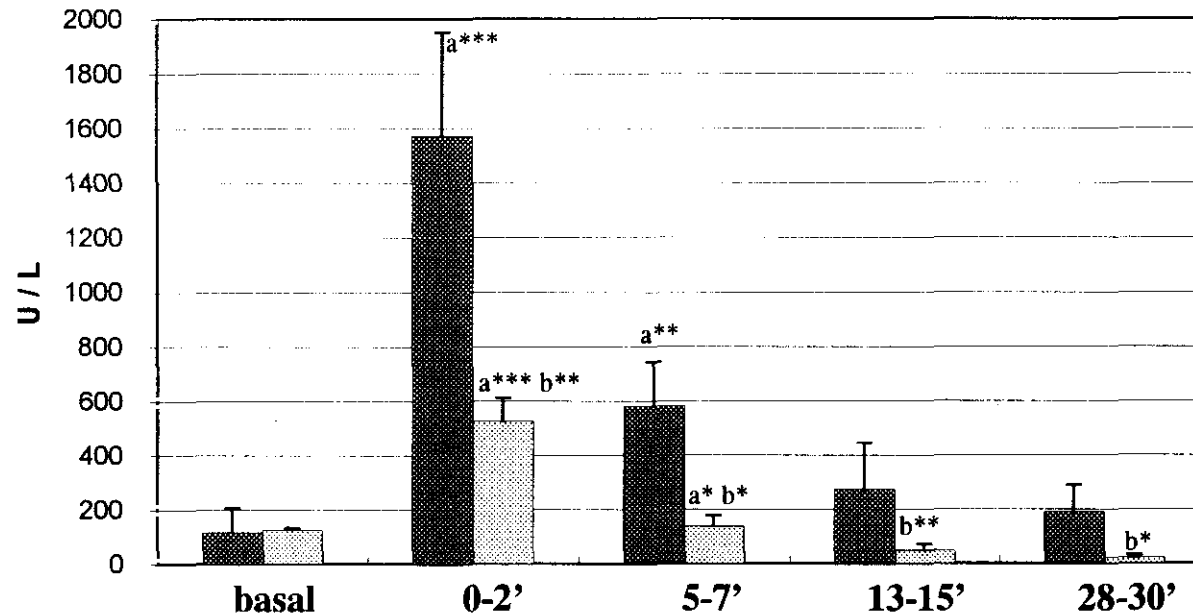


FIGURA 26 .- Niveles de CPK en el líquido efluente en condiciones basales y durante distintos intervalos de reperusión tras isquemia de 30 minutos. Columna oscura: experimentos control (n = 8). Columna clara: bajo tratamiento con CPA 10⁻⁶ M 30 minutos antes de la isquemia (n = 6). Los resultados se expresan como media + E.S.M. (a = intervalo correspondiente vs basal; b = CPA vs control; * = p < 0,05, ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

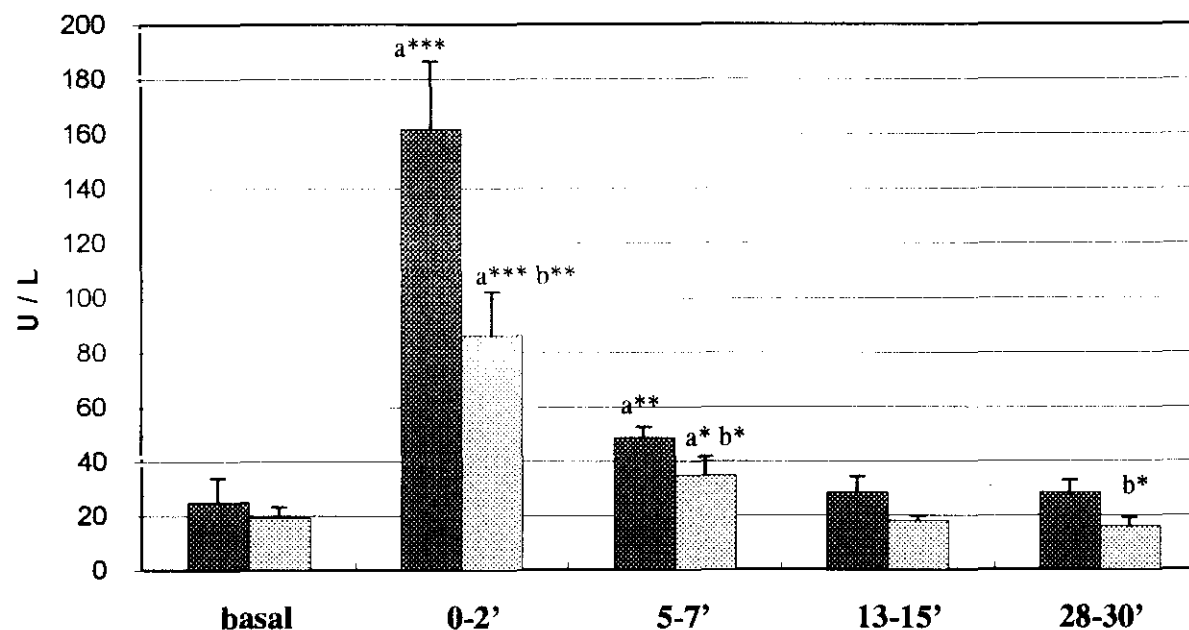


FIGURA 27.- Niveles de GOT en el líquido efluente en condiciones basales y durante distintos intervalos de reperusión tras isquemia de 30 minutos. Columna oscura: experimentos control (n = 8). Columna clara: bajo tratamiento con CPA 10^{-6} M perfundido 30 minutos antes de la isquemia (n = 6). Los resultados se expresan como media + E.S.M. (*a* = intervalo correspondiente vs valor basal; *b* = CPA vs control; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,001$).**

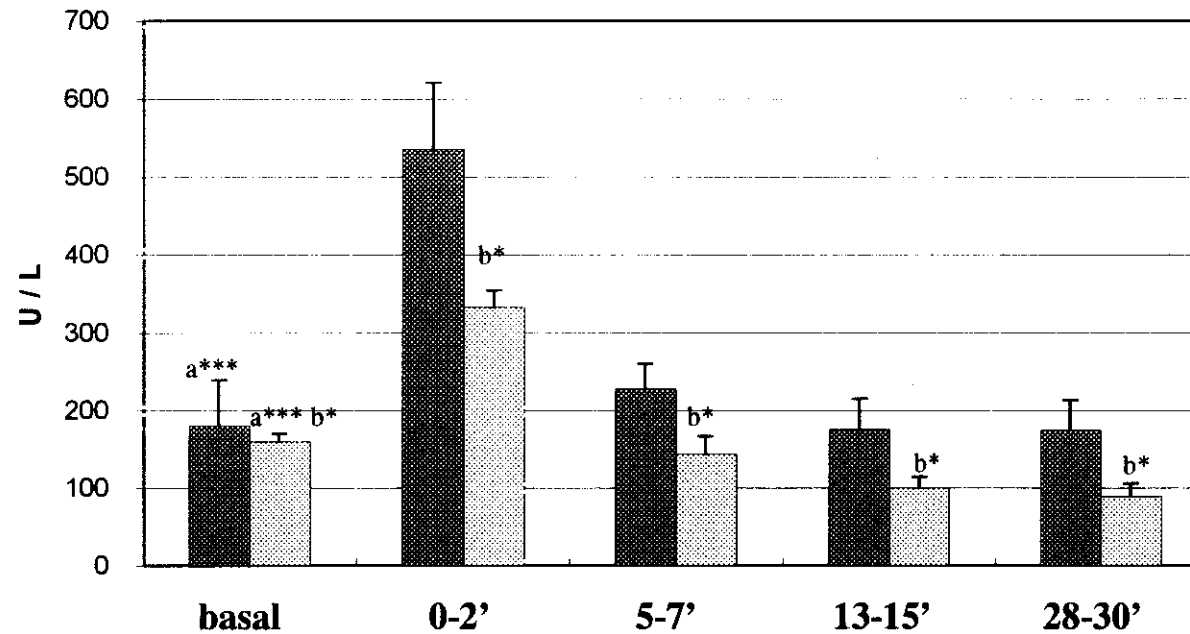


FIGURA 28.- Niveles de LDH en el líquido efluente en condiciones basales y durante distintos intervalos de reperusión tras isquemia de 30 minutos. Columna oscura: experimentos control (n=8). Columna clara: bajo tratamiento con CPA 10^{-6} M 30 minutos antes de la isquemia (n=6). Los resultados se expresan como media + E.S.M. (*a* = intervalo correspondiente vs basal; *b* = CPA vs control; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,001$).**

IV.5.- EFECTOS DE LA ISQUEMIA-REPERFUSION SOBRE PARAMETROS MORFOLOGICOS.

El estudio morfológico fue realizado por un histopatólogo con experiencia en el análisis microscópico de este tipo de muestras. Se le entregaron 6 muestras (3 de ischemia control y 3 del grupo pretratado con CPA 10^{-6} M) identificadas por un código numérico y se realizó el análisis a doble ciego.

Con el estudio inicial de los cortes semifinos se valoró ya la existencia de dos grupos diferenciados de muestras en cuanto al grado de lesiones: encontrando en las muestras del grupo control signos evidentes de la presencia de necrosis en bandas de contracción (Figura 31), no valorables en el grupo pretratado.

Los hallazgos ultraestructurales consistieron en un gradiente de lesiones. En el grupo bajo tratamiento en preisquemia con CPA 10^{-6} M los elementos celulares mostraban alteraciones fundamentalmente mitocondriales, consistentes en una dilatación masiva de ambas cámaras con aclaramiento de la matriz mitocondrial que les confería un aspecto ópticamente vacío. De forma focal se observaban concreciones osmiófilas intramitocondriales y menos frecuentemente estructuras mielínicas (Figura 29). Los capilares mostraban una estructura general mantenida sin anomalías parietales (Figura 30).

Por contraste, en el grupo de isquemia control se observó, de una parte, una acentuación de las alteraciones mitocondriales con dilatación más difusa y extensa de las mitocondrias y aumento de los depósitos intramitocondriales (Figura 32). Por otra parte, apareció una neta anomalía en el aparato contráctil de la célula con aparición de bandas de contracción, estructuras densas osmiófilas de morfología similar al del material de la línea Z, visibles ya en los cortes semifinos y confirmadas en los ultrafinos. Esta alteración afectaba de forma difusa o focal intensa a toda la célula (Figuras 31, 33 y 34).

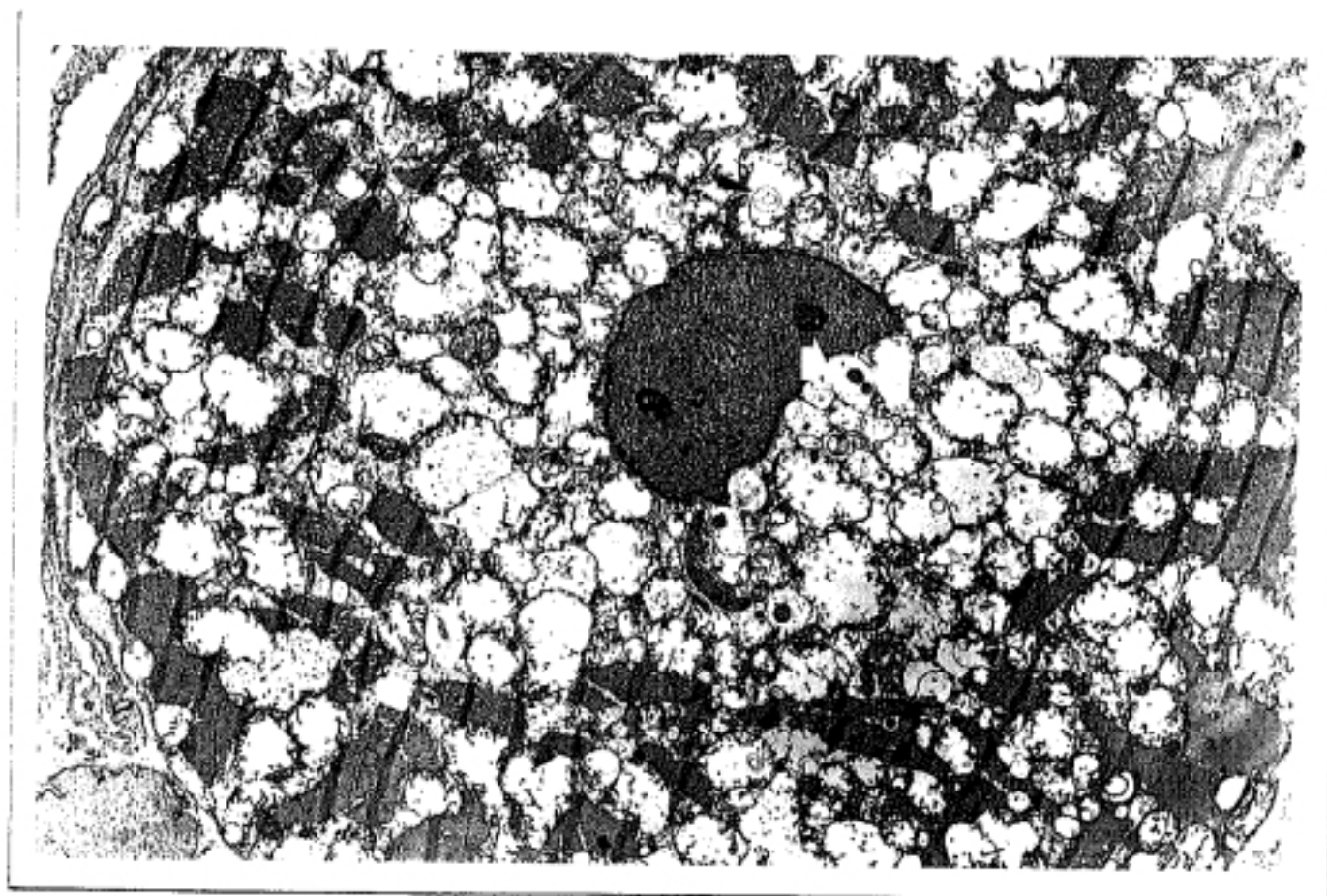


FIGURA 29.- Célula miocárdica cortada transversalmente en la que se puede ver una dilatación mitocondrial difusa con inclusiones densas intramitocondriales (flecha blanca) y ocasionales cuerpos mielínicos (flecha negra). No se observan anomalías nucleares. Grupo CPA 10^{-6} M. (Doble tinción 5000x)

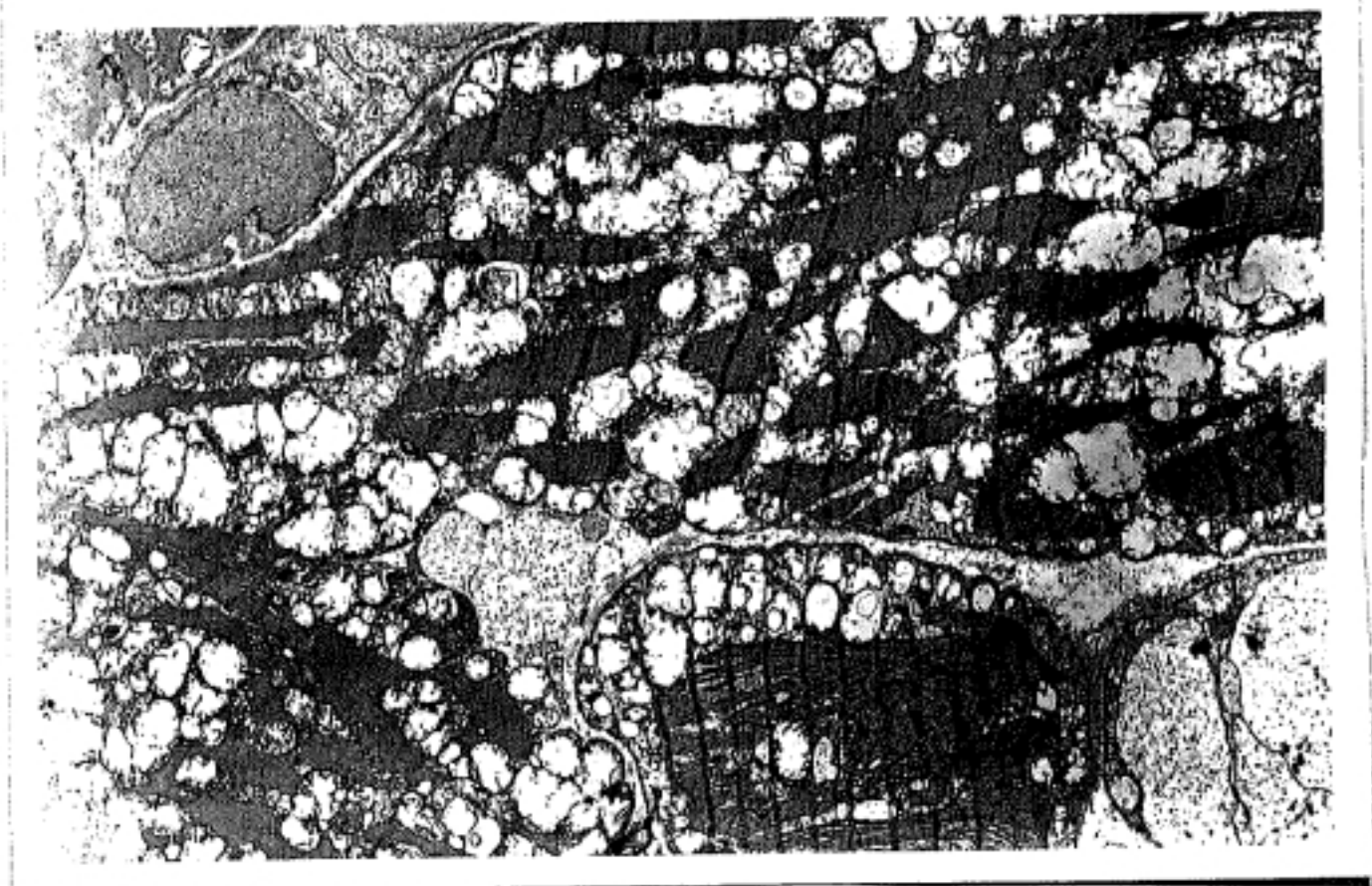


FIGURA 30.- Aspecto panorámico del corte que incluye tres fibras cardíacas con alteraciones morfológicas similares a las descritas en la fotografía anterior. No se observan anomalías intersticiales, existiendo dos capilares sin alteraciones relevantes. Grupo CPA 10^{-6} M. (Doble tinción 5000x)

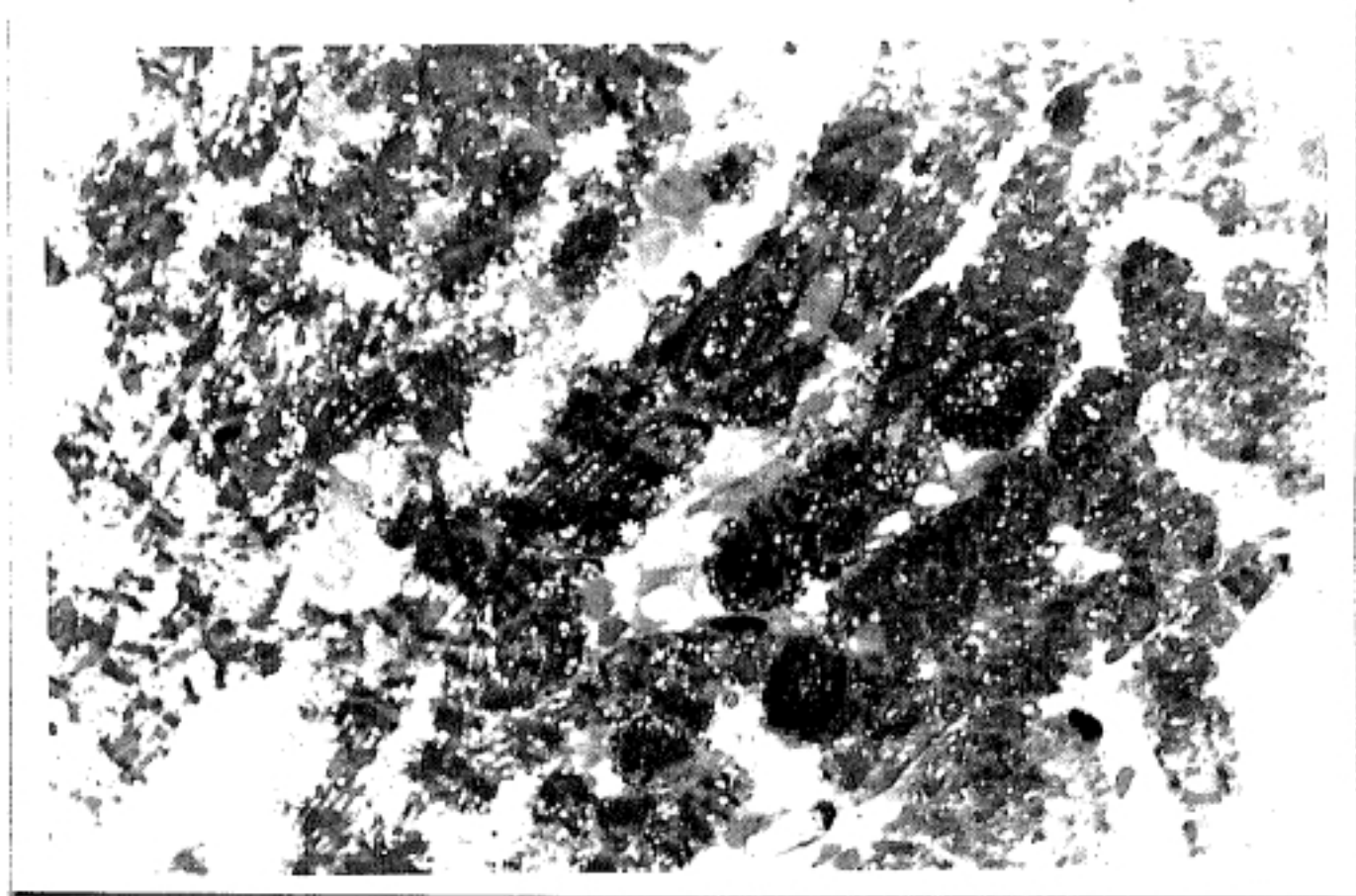


FIGURA 31.- Corte semifino en el que se han seccionado longitudinalmente las fibras miocárdicas. Puede verse como los citoplasmas están atravesados por estructuras lineales gruesas, densas y de margen desflecado que corresponden a bandas de contracción (asteriscos). Grupo control. (Reynolds 400x)

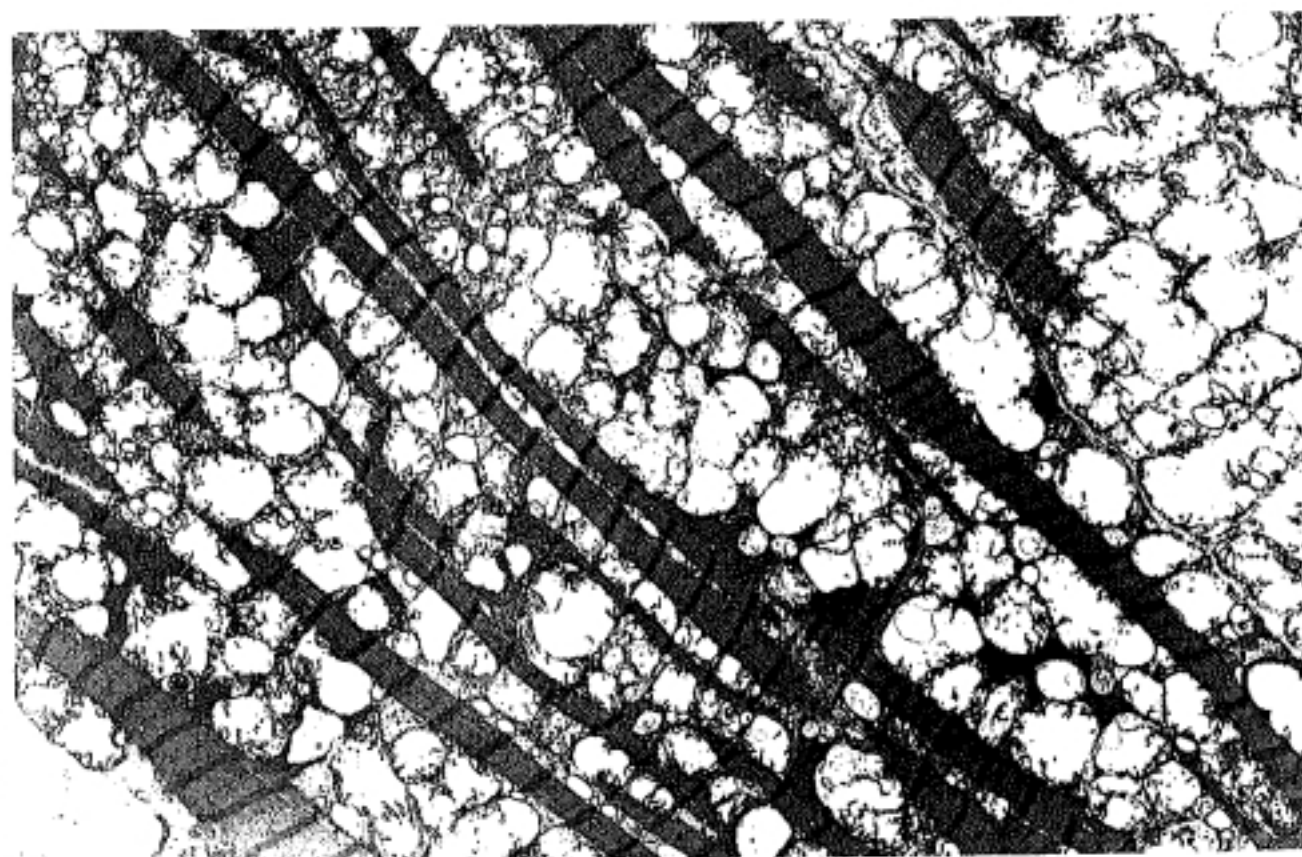


FIGURA 32.- Ultraestructuralmente se observa una vacuolización difusa e intensa de las mitocondrias que comprimen y deforman las miofibrillas. Grupo control. (Doble tinción 6250x)

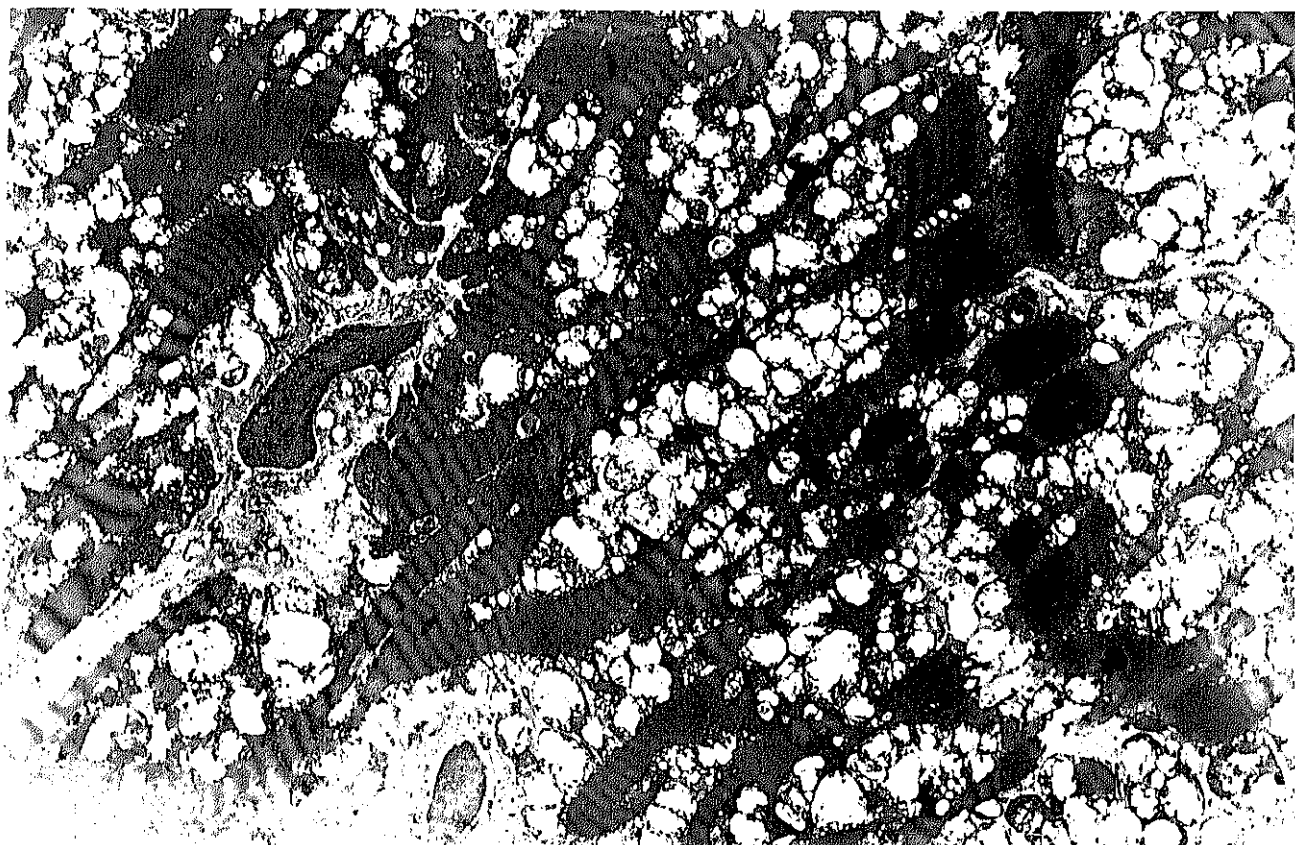


FIGURA 33.- La imagen incluye parte del citoplasma de dos células miocárdicas en las que, junto con la alteración mitocondrial descrita, se observa además un aparato contráctil en parte conservado en su estructura y en parte convertido en bandas densas homogéneas, que constituyen el sustrato ultraestructural de las bandas de contracción visibles en microscopía óptica. (Doble tinción 3750x)

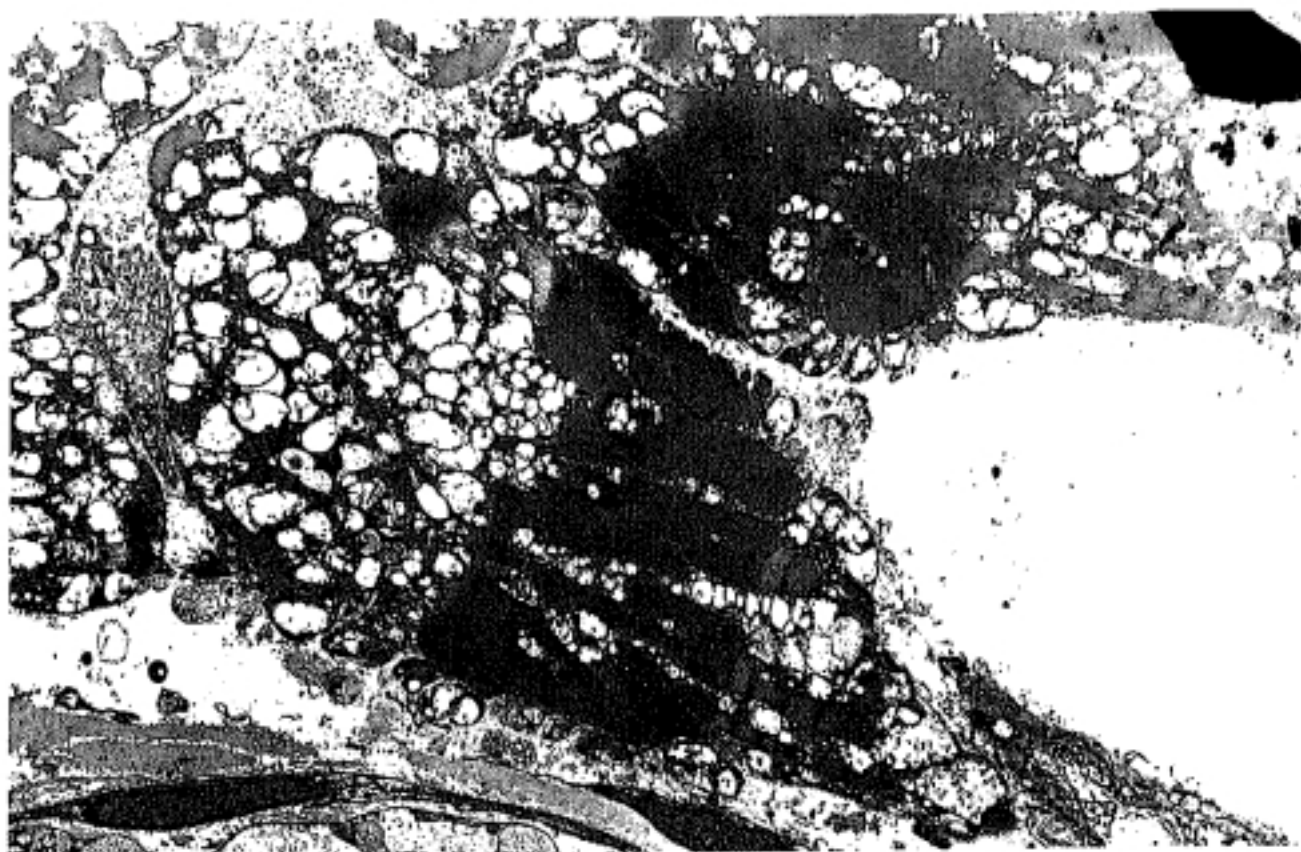


FIGURA 34.- Detalle a mayor aumento de una banda de contracción para mostrar su estructura homogénea similar al material constitutivo de la línea Z. (Doble tinción 5000x)

V.- DISCUSSION

Los resultados de este estudio han demostrado que, el ácido ciclopiazónico (CPA), un fármaco al que se atribuyen efectos específicos de bloqueo de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA) del miocardio (Seidler *et al*, 1989; Miller *et al*, 1990; Pery-Man *et al*, 1993), presenta un claro efecto cardioprotector frente a la isquemia en el corazón de conejo.

Este efecto antiisquémico se ha puesto de manifiesto tanto sobre parámetros funcionales contráctiles, como bioquímicos y morfológicos, ya que la caracterización de los efectos cardioprotectores debe ser realizada, necesariamente, sobre al menos dos de los parámetros anteriores (Reimer y Jennings, 1986). Con anterioridad, du Toit y Opie (1994) demostraron que el CPA presentaba efectos cardioprotectores sobre parámetros funcionales contráctiles en corazones de rata contundidos. Al contrario de lo encontrado por estos autores, nuestros resultados muestran que no existe dosis-dependencia del CPA en la protección frente a isquemia miocárdica, ya que los septa pretratados con CPA 10^{-6} M y sometidos a isquemia de 30 minutos obtenían, tras la reperfusión, una recuperación de la amplitud contráctil un 54,17% mayor que el grupo control, mientras que los tratados con CPA 10^{-5} M mejoraban sólo un 20,07% respecto a los controles.

- Homogeneidad de los grupos de experimentación.

Estos resultados no pueden ser atribuidos a falta de homogeneidad de los grupos de experimentación, pues no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en sus condiciones basales (Tabla 6). No obstante, aún podría argumentarse que, en el grupo de isquemia control, los valores medios de la frecuencia de estimulación y de la tensión de reposo eran ligeramente más elevados que los de los grupos restantes, y que la amplitud contráctil resultaba algo más baja que la obtenida en el grupo pretratado con CPA 10^{-6} M. Ello podría sugerir unas peores condiciones iniciales en el grupo control respecto a los grupos bajo tratamiento. En contra de esto tenemos el hecho de que las condiciones basales del grupo en que se administró CPA 10^{-6} M exclusivamente durante la reperusión, presentaban características bien diferenciadas en sentido contrario a las del grupo control y, sin embargo, el porcentaje de recuperación final y los niveles de enzimas no presentaron diferencias significativas respecto a este grupo. Más aún, Bourdillon y Poole-Wilson (1982) han descrito que la intensidad del daño miocárdico inducido por isquemia es independiente de la estimulación o no de los septa del corazón de conejo. Además, los experimentos de cada serie se realizaron de forma no consecutiva, alternando las series, con el fin de evitar la posible variabilidad intergrupo relacionada con el origen de los animales, alimentación o condiciones ambientales.

-Efectos atribuibles al solvente.

Tampoco pueden ser atribuidos estos efectos al solvente de CPA utilizado en nuestro estudio, dimetil-sulfóxido (DMSO). Es bien conocido que el DMSO presenta propiedades como atrapador de radicales libres ("free radical scavenger"; Rowe *et al*, 1983). La generación de radicales libres se ha propuesto como uno de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la aparición del daño miocárdico durante la isquemia-reperusión. De hecho, se ha observado un enorme incremento en la formación de éstos justo en los momentos iniciales de la reperusión (Hearse *et al*, 1973; Henry *et al* 1993). Sin embargo, el papel real de los radicales libres en el desencadenamiento del daño miocárdico por isquemia permanece motivo de controversia (Nohl *et al*, 1991). Si bien algunos autores han descrito cardioprotección frente a isquemia con el uso de inhibidores de la formación (Williams *et al*, 1991) y/o atrapadores de radicales libres (Engler y Gilpin, 1989; Naslund *et al*; 1990), otros no lo encuentran (Krinsky, 1988). En cualquier caso, no parece que en nuestros experimentos la acción cardioprotectora pueda ser atribuible al DMSO, ya que en los dos experimentos realizados únicamente con el solvente (DMSO) no se observaron diferencias aparentes con el efecto medio obtenido para el grupo de los experimentos control. Más aún, si ello fuera cierto, cabría esperar un efecto cardioprotector más intenso con el grupo de CPA a dosis más elevada, ya que la concentración de DMSO fue 10 veces mayor, mientras que los resultados obtenidos fueron contrarios.

-Registro y análisis automatizado de la contracción.

Un análisis exhaustivo de la literatura científica nos mostró la inexistencia de publicaciones en las que se analizaran las variaciones en el tiempo y, especialmente, las correlaciones entre los parámetros mecánicos más usuales (tensión desarrollada, tensión de reposo, $\pm dT/dt$ max y los tiempos característicos) durante el desarrollo de la isquemia, sobre la base de medidas realizadas contracción a contracción. El único trabajo relativamente relacionado fue el de Shine *et al* (1976). Sin embargo estos autores registraban tan sólo una contracción por minuto y aparentemente realizaron ajustes sobre los valores medios normalizados de todos los experimentos, lo que les impedía describir con precisión los fenómenos existentes y, en especial, aquellos que ocurren en períodos de tiempo muy breves. Esta pobreza de referencias contrasta con los estudios realizados a nivel celular y subcelular en experimentos de isquemia simulada (Walsh y Tormey, 1988; Miller y Tormey, 1995). El mejor conocimiento de cómo se afectan los diferentes componentes de la contracción y en qué curso temporal se realiza podría ayudarnos a explicar el mecanismo de la acción antiisquémica de los fármacos conocidos y a diseñar de forma racional nuevas estrategias farmacológicas de prevención del daño isquémico.

Por todo ello hemos desarrollado un sistema de registro y análisis automatizado de la contracción, específicamente diseñado para nuestro modelo experimental. El grado de precisión de las medidas obtenidas fue

de ± 3 msg para las medidas de tiempo (frecuencia de muestreo 6 msg) y de 0,0145 g para las tensiones. La precisión teórica de medida de tensiones fue aproximadamente 6 veces mejor que la real, ya que nuestro equipo de medida no reunía condiciones óptimas para evitar el ruido mecánico. Así, sobre 12640 medidas en condiciones basales realizadas para ver la variabilidad de la tensión, obtuvimos una desviación de 0,042 g. Por ello, el grado de precisión real de las medidas sobre tensión puede estimarse en 0,084 g (2 veces la desviación estandar). Es interesante destacar que la realización de un suavizado sobre los valores de amplitud para cada contracción mejoró enormemente la exactitud en las medidas cuando se comparaban éstas con las realizadas sobre experimentos medios. Ello es fruto de atenuar el efecto de dispersión originado por el ruido mecánico, por lo que, con este artificio probablemente incrementemos el grado de precisión de las medidas de tensión.

La medida del 90% - 95 % de relajación como índice de duración de la contracción es de uso habitual (Yard *et al*, 1994; Takahashi *et al*, 1995), dada la dificultad de precisar con exactitud el momento en que ésta finaliza.

El desarrollo informático realizado con estos fines permitirá que, en adelante, éste pueda ser aplicado con una gran economía de medios al estudio de los efectos de otros fármacos que alteren contractilidad miocárdica cualquiera que sea las condiciones de estudio.

- CARACTERIZACION DE LOS EFECTOS CONTRACTILES DEL CPA EN MIOCARDIO NO ISQUEMICO.

- Selección del rango de dosis y tiempo de estabilización del CPA.

La selección de un rango de dosis útil de CPA para nuestra preparación de tabique interventricular de corazón de conejo, se realizó estudiando curvas dosis-efecto sobre contractilidad en el entorno de concentraciones ya descritos en la literatura para la mayoría de especies animales en que éste ha sido utilizado: 10^{-7} - 10^{-6} M en corazón de rata (Du Toit y Opie, 1994; Takahashi *et al*, 1995) y de cobayo (Yard *et al*, 1994), 10^{-5} M en corazón de rana (Badaoui *et al*, 1995) y en corazón de rata (Pery-Man *et al*, 1993), y 10^{-4} M en corazón de conejo (Baudet *et al*, 1993). Salvo en el estudio de Du Toit y Opie, el tejido miocárdico (papilares, trabéculas o aurículas) no era perfundido arterialmente, sino bañado o superfundido por una solución nutritiva con CPA.

En tres experimentos, dosis acumulativas de CPA desde 10^{-9} M a 10^{-6} M no produjeron modificaciones significativas sobre la tensión de reposo, si bien ésta descendía ligeramente (Figura 9), sin embargo CPA 10^{-6} M sí que provocaba un ligero descenso significativo de la amplitud de contracción (Figura 10). No obstante, dicho descenso significativo no pudo alcanzarse posteriormente en el grupo de isquemia-reperfusión con dosis unitarias de CPA 10^{-6} M (n=11). Se evidenció también un alargamiento estadísticamente significativo de la fase diastólica del ciclo

contráctil (tiempos para $-dT/dt$ max y 90% de relajación; Tabla 8).

Se tomó la infusión del fármaco durante 30 minutos antes de iniciar la isquemia, puesto que la estabilización de la preparación con cada nueva dosis de fármaco en los experimentos con dosis acumulativas precisaba unos 20 minutos por término medio.

Dado que 10^{-6} M era la concentración más baja en la que conseguíamos observar los efectos lusitrópicos negativos descritos como característicos de la acción de este fármaco, escogimos esta dosis de CPA para realizar el resto de experimentos. Seleccionamos igualmente una dosis mayor de CPA (10^{-5} M), para comprobar el hipotético carácter dosis-dependiente de la acción farmacológica del CPA (Du Toit y Opie, 1994; Yard *et al*, 1994).

- Efectos del CPA sobre contractilidad miocárdica.

Los efectos sobre contractilidad miocárdica de CPA a la concentración de 10^{-6} M resultaron sutiles: descensos ligeros, no significativos, tanto de la tensión de reposo, como de la amplitud, $+dT/dt$ max y $-dT/dt$ max (Figura 35; tabla 7). Junto a esto, existió un alargamiento progresivo de la cronología de la contracción sobre todos los tiempos estudiados que sólo empezaba a ser significativo en la fase de relajación (tiempos para $-dT/dt$ max y 90% de relajación), con una prolongación media en torno al 10% respecto a su basal (Tabla 8).

Por el contrario, el efecto del CPA a la concentración de 10^{-5} M sobre la contractilidad miocárdica no sigue la línea de los resultados obtenidos con la concentración inferior (Figura 36; tabla7). La amplitud contráctil sí que cae de forma significativa (15,67%; $p < 0,05$), pero la tensión de reposo no desciende, sino que tiende a elevarse aunque sea de forma no estadísticamente significativa (Figura 14). Por otra parte, los tiempos de contracción se alargan llamativamente, pero a costa de una prolongación de la fase de contracción y, en concreto, de la fase inicial de la misma, con un alargamiento del t para el $+dT/dt$ max de un 81,42% (Tabla 8; figura 16). Sorprendentemente, el alargamiento de la fase de relajación, medido desde el tiempo para el pico de contracción, fue únicamente de un 20,32% para el tiempo del $-dT/dt$ max y de un 14,82 % para el tiempo del 90% de relajación. En la misma línea, la máxima velocidad de contracción cayó el doble que la máxima velocidad de relajación (39,31 vs 20%, respectivamente).

Por tanto, es evidente que la concentración menor utilizada (10^{-6} M) afecta preferencialmente a la cronología de la relajación, mientras que la concentración superior (10^{-5} M) mantiene los efectos observados con la dosis anterior (prolongación del 10-14% en el tiempo para el $-dT/dt$ max), pero su efecto fundamental se observa especialmente sobre contracción (disminución significativa de la tensión desarrollada) y, especialmente, sobre la fase inicial de la misma (prolongación del tiempo de inicio de la contracción, importante disminución del $+dT/dt$ max y muy llamativa prolongación de su tiempo).

Estos resultados contrastan en parte con los obtenidos hasta la fecha por otros autores, y especialmente con la interpretación que éstos hacen de los mismos. Yard *et al* (1994), trabajando sobre aurícula izquierda de cobayo bañada con solución nutritiva y CPA 10^{-5} y 10^{-4} M, a 30° C y estimuladas a 2,5 Hz de frecuencia, encuentran una prolongación de la contracción a expensas fundamentalmente del alargamiento de la fase de relajación en todos los casos. Igualmente, describen descensos de la tensión desarrollada, máxima velocidad de contracción y máxima velocidad de relajación, y una ligera elevación de la tensión de reposo. Todos estos efectos tendrían un comportamiento concentración-dependiente. Sin embargo, las diferencias significativas entre estas dos dosis de fármaco sólo se manifiestan en el descenso de la tensión desarrollada, del $+dT/dt$ max y del $-dT/dt$ max.

Pery-Man *et al* (1993) y Takahashi *et al* (1995) describen también el preponderante efecto lusitrópico negativo del CPA 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M sobre el músculo papilar de rata.

Baudet *et al* (1993), trabajando con músculo papilar y trabéculas ventriculares de corazón de conejo bañadas con solución nutritiva y CPA 10^{-4} M, a 30° C, y estimuladas a 0,5 Hz, encuentran una prolongación de la duración de la contracción con un aumento del tiempo para pico del 63% y del tiempo para el 50% de relajación de un 43%, junto a un descenso de la fuerza de contracción de un 45%. Este es el único estudio realizado en conejo y que, al igual que el nuestro, encuentra una

prolongación de la fase de contracción más acentuada que la de relajación. Desafortunadamente, no comparan el efecto de varias concentraciones de fármaco y, más aún, obvia la discusión de esta aparente paradoja.

Estos resultados de la literatura científica presentan grandes diferencias metodológicas que hacen difícil la comparación con nuestros resultados. En todos los casos descritos se trabaja sobre preparaciones de distintas especies animales no perfundidas arterialmente como la nuestra, sino bañadas por una solución nutritiva, que a su vez varía de un autor a otro. Las condiciones de estimulación también son muy variadas (0,5 a 2,5 Hz) y el soporte informático para obtener los registros, cuando existe, no permite un grado de precisión y discriminación en las medidas comparable al alcanzado por el nuestro. Es importante destacar la diferente contribución del RS a la contracción (Bers, 1985) y a la relajación (Bassani *et al*, 1994) miocárdicas en función de la especie animal estudiada, por lo que la extrapolación directa de resultados de una especie animal diferente debe hacerse, cuando menos, con gran cautela.

En definitiva, a la concentración menor, el CPA tendría un comportamiento acorde con lo generalmente descrito en la literatura, esto es: aumento de la duración de la contracción a expensas de prolongar la fase de relajación (Pery-Man *et al*, 1993; Yard *et al*, 1994; Takahashi *et al*, 1995), mientras que a la mayor concentración, si bien se mantiene el

efecto lusitrópico negativo, predomina el alargamiento de la fase inicial de la contracción (el tiempo para el $+dT/dt$ max suele corresponder al 30% de la duración del tiempo para el pico) como responsable de la prolongación del ciclo contráctil. Llama la atención que el extraordinario alargamiento del tiempo para el $+dT/dt$ max vaya acompañado de un descenso significativo de la amplitud contráctil y del $+dT/dt$ max, quizás como expresión de la aparición de efecto inotrópico negativo a elevadas concentraciones del fármaco.

Nuestros resultados exigen una discusión acerca del posible mecanismo por el que ocurre tal aparente disparidad de efectos con sólo un incremento de un orden de magnitud en el rango de concentraciones estudiado. No existe duda de que el CPA produce una inhibición selectiva de la SERCA en un nivel de concentraciones por debajo de los estudiados por nosotros. En efecto, Seidler *et al* (1989) demostraron una relación estequiométrica entre la unión del CPA y el bloqueo de la SERCA, así como su especificidad de inhibición no actuando frente a otras ATPasas de membrana. Más aún, Yard *et al* (1994) han cuantificado que, en vesículas aisladas de RS de miocitos ventriculares de cobayo, el CPA bloquea por completo la captación de Ca^{2+} por parte del RS con una IC_{50} de $0,2 \mu M$. Es interesante tener en cuenta que la IC_{50} para inhibir la ATPasa es función de la concentración de ATP en el medio, elevándose desde $0,2 \mu M$ a $1 \mu M$ con niveles de ATP en el rango milimolar. Conviene destacar también que la acción del CPA es selectiva, ya que Takahashi *et al* (1995) han demostrado que este fármaco, a

concentraciones en el rango de las empleadas por nosotros, no altera la relación pCa/tensión desarrollada en células desnudas de miocardio de rata sin RS funcional, lo que evidencia la falta de efecto directo del CPA sobre la maquinaria contráctil. Tampoco encontraron efecto del CPA sobre corrientes de membrana bien en situación de estado estacionario o bien sobre la corriente de pico. Ello evidencia que el CPA parece no afectar las corrientes iónicas correspondientes a la traslocación de electrolitos que ocurren durante el ciclo de contracción-relajación miocárdica. También se ha descrito que en vesículas de sarcolema de miocitos de rata el CPA, 0,3-30 μM , no inhibe el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de membrana. Utilizando técnicas aún más elegantes, Kirby *et al* (1992) han publicado resultados en rata similares usando la thapsigargina, otro de los inhibidores específicos de la SERCA.

Se podría intentar explicar estos efectos apuntando la posible la presencia de efectos colaterales de este fármaco, actuando a otros niveles distintos a la SERCA, y poniéndose de manifiesto sólo a elevadas concentraciones. De forma intuitiva esta hipótesis ya había sido manifestada con anterioridad (Baudet *et al*, 1993). No obstante, está por comprobar si estos efectos guardan relación con el posible bloqueo parcial de los canales de Ca^{2+} tipo L, responsables de la liberación del Ca^{2+} activador del RS y, por tanto, del inicio de la contracción, tal y como se ha demostrado para muy altas concentraciones de thapsigargina (Buryi *et al*, 1995). Sin embargo, esta hipótesis parece poco factible, ya que los estudios iniciales no encontraron efectos del CPA sobre otros sistemas

distintos de la SERCA (Takahashi *et al*, 1995). En cualquier caso, si con una concentración de 10^{-5} M existe un bloqueo parcial, con 3×10^{-5} M se debería haber manifestado más intensamente, y sin embargo los resultados fueron indistinguibles de los obtenidos con la dosis anterior.

Cabría explicar nuestros resultados sobre contractilidad en base a que la dosis menor usada, 10^{-6} M, en condiciones basales (concentración de ATP $\simeq 5$ mM/kg; Katz, 1992) produciría un bloqueo parcial de la SERCA ($IC_{50} = 1 \mu\text{M}$ con concentraciones altas de ATP; Yard *et al*, 1994). Concentraciones por encima de ésta, 10^{-5} M, podrían producir un bloqueo total. En nuestro caso éso lo sugiere el hecho de que la concentración de 3×10^{-5} M no produce efectos adicionales sobre parámetros contráctiles distintos de los obtenidos con 10^{-5} M. Si se admite que CPA está exhibiendo efectos debidos a su acción selectiva (bloqueo de la SERCA), un bloqueo parcial de la misma podría traducirse en un retraso de la recaptación del calcio citosólico durante la fase de relajación, sin que el total de calcio recaptado fuera menor. Por el contrario, un bloqueo total de la SERCA haría que los fenómenos de contracción y relajación miocárdica ocurrieran como consecuencia de la acción vicariante de otros sistemas involucrados, en ausencia funcional del RS.

En condiciones fisiológicas se ha cuantificado la contribución del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ durante la etapa de relajación, y en miocitos de conejo se ha calculado que el Ca^{2+} transportado por el intercambiador

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es del 28 % frente al 70 % del recaptado por la SERCA y el 2 % extruido del citosol por los sistemas de transporte lento (captación mitocondrial y Ca^{2+} ATPasa del sarcolema; Bassani *et al*, 1994). Por otra parte, es sabido que tanto el ventrículo de conejo como el de cobayo (similares al humano en su dependencia contráctil del RS) pueden desarrollar actividad de contracción plena en ausencia del calcio del RS (aunque a una frecuencia bastante menor) por activación directa de los miofilamentos por parte del flujo de Ca^{2+} transsarcolémico (Langer, 1992). De hecho, el corazón de rana, que no presenta casi RS, depende por completo de la entrada de Ca^{2+} a través de membrana para su contracción (Badaoui *et al*, 1995). Igualmente, es sabido que la contracción miocárdica en ratas neonatas depende, fundamentalmente, del influjo de Ca^{2+} transsarcolémico (Fabiato y Fabiato, 1978; Bers *et al*, 1981; Tanaka y Shigenobu, 1989) a diferencia de lo que ocurre en la rata adulta. Aún más, en el ventrículo de cobayo (similar al de conejo) el bloqueo de los canales de salida de Ca^{2+} del RS con ryanodina, no disminuye la tensión desarrollada, pero prolonga la duración de la contracción un 50% por término medio (Lewartowski *et al*, 1990). Basándose en este fenómeno, se ha interpretado la función del RS como la de un amplificador del aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante la contracción, de forma que la liberación de calcio calcio-inducida (Fabiato, 1983) tendría como finalidad aumentar la velocidad de contracción (Langer, 1992). Junto a todo lo dicho, hay que añadir que el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, si bien no parece tener un papel fundamental en la entrada de Ca^{2+} durante la contracción (Bassani *et al*, 1994) en condiciones

fisiológicas, y sólo presenta un papel secundario durante la relajación en presencia de un RS funcionante, podría asumir una capacidad de funcionamiento mayor si se dan las condiciones de activación necesarias (Langer y Peskoff, 1996), como puede ocurrir durante la diástole en presencia de un bloqueo de la SERCA con el consiguiente aumento de la $[Ca^{2+}]_i$.

Resumiendo, nuestra hipótesis plantea que la diferencia de resultados observada con las dos concentraciones del fármaco expresa los efectos de un bloqueo parcial de la SERCA frente a los de un bloqueo probablemente completo con la mayor concentración empleada. El ligero alargamiento de la fase de relajación, ya observado con la menor concentración de CPA, vendría originado por una menor disponibilidad de sistemas para recaptar calcio hacia el RS, pese a una hipotética compensación parcial por un mayor funcionamiento del intercambiador Na^+/Ca^{2+} de membrana, si bien a una velocidad mucho menor en comparación con la SERCA. Por otra parte, el bloqueo completo de la SERCA, además de seguir manifestando este efecto sobre la relajación de forma más marcada, traería implícita también una disminución llamativa de la fase de contracción (disminución de tensión desarrollada y $+dT/dt$ max, prolongación de los tiempos de inicio de contracción y pico, y muy especialmente, del tiempo para el $+dT/dt$ max) como consecuencia de la pérdida del mecanismo de aceleración de la velocidad de contracción a través de la liberación de calcio calcio-inducida (Fabiato, 1975).

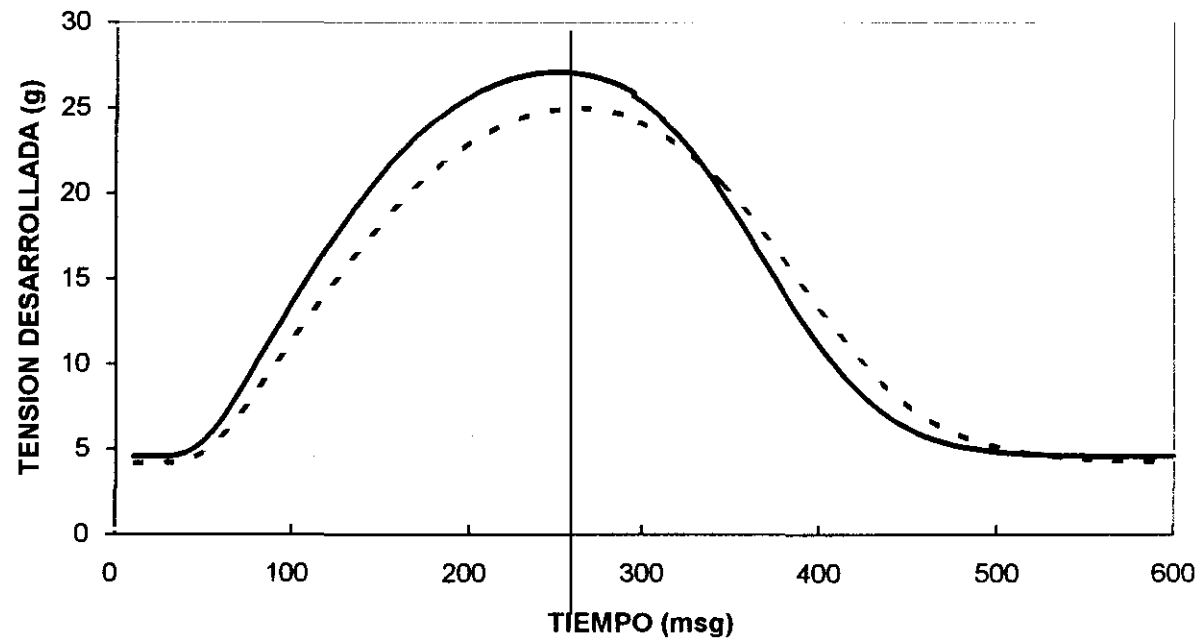


FIGURA35- Efectos del CPA 10^{-6} M sobre la contracción miocárdica basal en un experimento aislado: disminuye ligeramente la tensión de reposo y la amplitud de contracción, y prolonga la duración de la contracción a expensas fundamentalmente de la fase diastólica. Línea continua: media de 100 contracciones basales. Línea de puntos: media de 100 contracciones bajo tratamiento con CPA 10^{-6} M

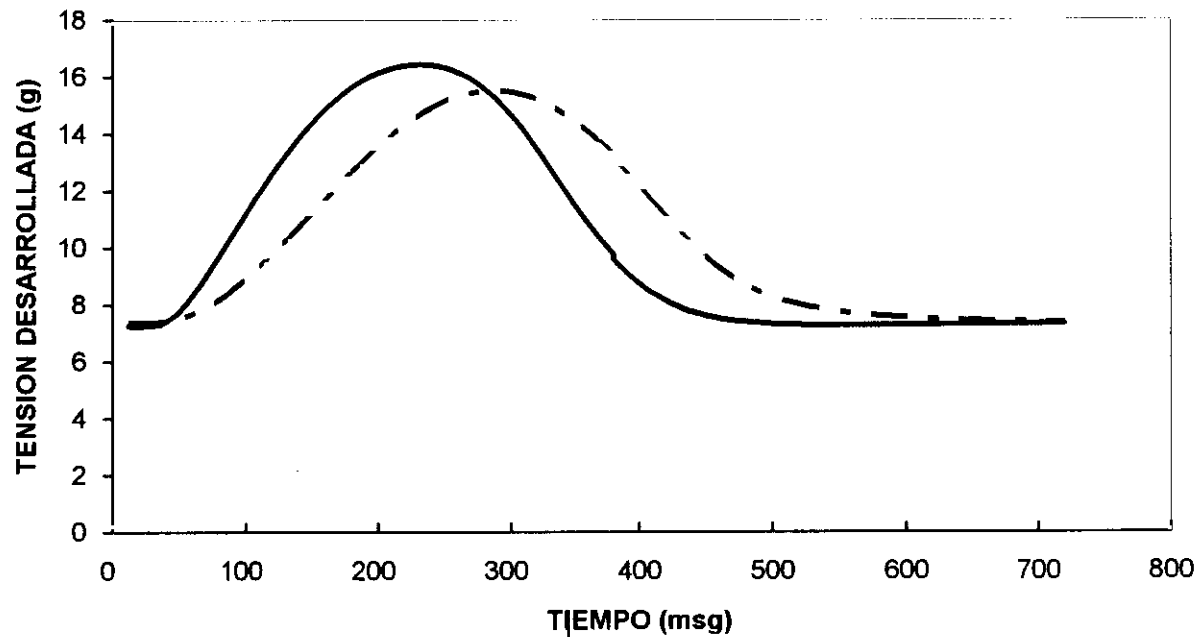


FIGURA 36.- Efectos del CPA 10^{-5} M sobre la contracción miocárdica basal en un experimento aislado: aumenta ligeramente la tensión de reposo, disminuye significativamente la amplitud contráctil y aumenta la duración de la contracción prolongando fundamentalmente la fase inicial de la misma. Línea continua: media de 100 contracciones basales. Línea de puntos y rayas: media de contracciones bajo tratamiento con CPA 10^{-5} M.

- CARACTERIZACION DE LOS EFECTOS DE LA ISQUEMIA SOBRE PARAMETROS CONTRACTILES.

Es sobradamente conocido el que la isquemia disminuye la tensión desarrollada (TD) y que eleva la tensión de reposo mientras desciende, hasta desaparecer, la tensión desarrollada, manteniéndose en línea ascendente hasta el final de la isquemia (Shine *et al*, 1976; Bourdillon y Poole-Wilson, 1981; Salinas *et al*, 1995). Este aumento de la tensión de reposo que ocurre tras varios minutos de isquemia se ha asociado clásicamente a la elevación de los niveles de calcio intracitosólico (Bourdillon y Poole-Wilson, 1982; Steenbergen *et al*, 1987; Lee y Allen, 1992), queriéndose establecer relación entre la máxima elevación de la tensión de reposo durante la isquemia con el porcentaje de recuperación de la amplitud de contracción tras la reperfusión. Nuestros resultados en este aspecto genérico siguen la línea de lo ya descrito, por lo que no abundaremos en su discusión.

Más interesante nos parece destacar que este estudio es el primero que caracteriza, contracción a contracción, la caída de la tensión desarrollada, $+dT/dt$ max y $-dT/dt$ max en la isquemia, así como del acortamiento del tiempo para el pico y del tiempo para el 90% de relajación hasta que alcanzan valores próximos a cero. Esto nos ha permitido el cálculo de las constantes de tiempo de caída para cada uno de estos parámetros y su ajuste a funciones matemáticas (mono- o biexponenciales). Con ello hemos caracterizado la isquemia control y

hemos podido comparar el diferente comportamiento de la misma respecto a la isquemia en corazones pretratados con dos dosis de CPA (10^{-6} M y 10^{-5} M).

- Efectos de la isquemia sobre contractilidad en septa no tratados.

La isquemia da lugar a una pérdida de contractilidad que comienza muy precozmente (al cabo de 10 sg por término medio). Este efecto no parece achacable a la disminución del ATP intracelular que tarda varios minutos en ponerse de manifiesto (Katz, 1992). No obstante, algunos autores han sugerido la posible compartimentalización del ATP celular, con lo que la deplección del compartimento de ATP relacionado con la contractilidad sí que podría ser muy precoz (Weiss y Hiltbrand, 1983). Conviene recordar, por otra parte, que la pérdida del efecto "manguera de jardín" (Vogel *et al*, 1982), como consecuencia del cese del flujo coronario sí que podría contribuir parcialmente al inicio precoz de este proceso. Dado que la acidosis tiene un conocido efecto inotrópico negativo, disminuyendo la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} (Luciani *et al*, 1993) y disminuyendo tanto la captación de Ca^{2+} por el RS (Fabiato, 1985), como la salida (Blanchard y Solaro, 1984), hay diversos estudios que identifican este factor como responsable principal del rápido descenso de la amplitud contráctil durante la isquemia (Cobbe y Poole-Wilson, 1980). Sin embargo, otros estudios, trabajando con electrodos intramiocárdicos en la misma preparación del septum interventricular de corazón de conejo, no encuentran dicha correlación

en las fases iniciales de la isquemia (Weiss *et al*, 1984). De hecho, se precisa bastante tiempo para poder cuantificar una disminución de pH_i subsecuente a la isquemia.

Los resultados de nuestro trabajo no nos permiten discutir la contribución relativa de cada uno de los mecanismos anteriores a la pérdida de contractilidad inducida por la isquemia. Lo que sí hemos constatado es que la caída de la tensión desarrollada o amplitud contráctil no es un proceso que ocurra por un único mecanismo, ya que hemos observado al menos dos fases diferenciadas: una inicial rápida ($\tau=0,43$ min) y, a continuación, otra más lenta ($\tau=2,74$ min).

Estos resultados contrastan con los de Shine *et al* (1976), que describieron que la pérdida de la tensión desarrollada era un proceso monoexponencial. Pensamos que tal discrepancia está en relación con los problemas metodológicos ya comentados.

- *Relación entre pérdida de tensión desarrollada y velocidad de relajación.*

Es interesante destacar que la caída de la máxima velocidad de relajación ocurre al mismo tiempo que la de la tensión desarrollada. Más aún, en todos los experimentos existe correlación lineal entre los valores normalizados (%) de tensión desarrollada y el valor normalizado (%) de la $-dT/dt_{max}$ para todas y cada una de las contracciones desde el inicio

de la isquemia (Figura 37 A). Además, la pendiente está próxima a la unidad. Ello indica que el/los proceso/s que condicionan la desaparición de la tensión desarrollada y la máxima velocidad de relajación son probablemente los mismos, cualquiera que sea la fase considerada. Es más, el hecho de que las constantes de tiempo (τ) de las dos fases del $-dT/dt_{max}$ (0,37 y 2,44 min para las fases rápida y lenta, respectivamente) sean ligeramente menores que las de la tensión desarrollada (0,43 y 2,74 min), parece poner de manifiesto que el/los proceso/s que condicionan la desaparición de la tensión desarrollada afectan algo más rápidamente a los fenómenos de relajación.

La afectación precoz de la relajación durante la isquemia ya había sido descrito por otros autores (Shine *et al*, 1976; Bourdillon y Poole-Wilson, 1981; Weiss *et al*, 1984), pero consideramos novedosa nuestra aportación de la existencia de correlación entre la disipación de tensión desarrollada y la de la máxima velocidad de relajación, así como el que esta última sea ligeramente más veloz que la primera.

- Relación entre la pérdida de tensión desarrollada y velocidad de contracción.

A diferencia de lo ya descrito para la velocidad de relajación, la caída de la máxima velocidad de contracción es el evento más tardío de los que ocurren en la isquemia (meseta de 50 sg; figura 22). Por ello, la correlación entre valores normalizados de tensión desarrollada frente a

+dT/dt max, en isquemia, sólo tiende a ser lineal cuando se ha perdido aproximadamente el 40% de TD (Figura 37 B). En otras palabras, el/los mecanismo/s involucrado/s en la afectación inicial de ambos procesos es/son absolutamente diferentes, si bien pueden tener un mecanismo/s común en la fase tardía de la isquemia (pérdida > 40% de TD).

En condiciones basales la máxima velocidad de contracción ha sido puesta en relación con el correcto funcionamiento del retículo sarcoplásmico, responsable de catalizar, a través del mecanismo de liberación de calcio calcio-inducido (Fabiato, 1975), la aceleración del proceso de contracción miocárdico (Langer, 1992). Bajo isquemia, el mantenimiento durante 50 sg de la +dT/dt max (tiempo en el que ya ha desaparecido un 40% de TD) parece claramente indicativo de la correcta capacidad funcional del RS durante este tiempo inicial.

- Relación entre la pérdida de la tensión desarrollada y el acortamiento de la duración de la contracción.

En los segundos iniciales de isquemia se produce un acortamiento monoexponencial en la duración del estado activo (t para el pico y el 90% de relajación), evidente incluso antes de una pérdida efectiva de tensión desarrollada (Figuras 24, 25 y 38 A). Este acortamiento es rápido (más veloz para la relajación), ya que se completa antes de los 2,5 min (τ 0,60 y 0,48 min, respectivamente). Aunque la disminución media en valores absolutos es de 87 msg para el t para el pico y de 119 msg para el 90%

de relajación, proporcionalmente es un acortamiento mucho mayor para la contracción (37 % vs 15,5%). Tras los 2,5 min el tiempo para el pico se mantiene, mientras que el tiempo de relajación se alarga lenta y progresivamente, superando las condiciones de partida.

En síntesis, durante los 2-3 minutos iniciales de isquemia se produce un acortamiento asimétrico de la duración de la contracción (proporcionalmente mayor en la fase de contracción). Existe un desplazamiento hacia la izquierda del pico de contracción, con mantenimiento inicial de la máxima velocidad de contracción (50 msg) y una pendiente de la fase de relajación progresivamente menor (más lenta) (Figura 38 A).

En conclusión, y a la luz de los conocimientos actuales podríamos interpretar de forma global nuestros resultados del efecto de la isquemia sobre contractilidad en condiciones control del siguiente modo:

1.- La rápida disminución de tensión desarrollada desde los momentos más iniciales de la isquemia indican una menor disponibilidad o aprovechamiento global del Ca^{2+} , ya sea por un menor influjo a través de los canales voltaje-dependientes de membrana, por una menor participación del RS, o por una pérdida de sensibilidad de las proteínas contráctiles al calcio (Luciani *et al*, 1993).

2.- Esta disminución de tensión desarrollada no es incompatible con un mantenimiento de la máxima velocidad de contracción. Ello podría explicarse si la velocidad con la que el calcio penetra al citosol (mayoritariamente desde el retículo sarcoplásmico, proceso pasivo a favor de gradiente) se mantuviera, aun a pesar de que la cantidad total de calcio que difunde fuera menor (disminución de la TD). Es interesante destacar que la disminución de TD sufre una fase rápida de caída (τ de 0,43 min). Esta fase podría ser consecuencia de la menor eficacia de recaptación total del calcio citosólico por parte de la SERCA y, consecuentemente, de una menor disponibilidad de calcio para ser liberado.

3.- La velocidad de relajación se afecta mucho más prematuramente que la de contracción debido a que ésta última es un proceso pasivo, mientras que la relajación requiere extrusión activa del calcio activador en cada contracción. La disminución de la máxima velocidad de relajación en los tiempos iniciales podría estar relacionada con una más rápida afectación de la velocidad de recaptación del calcio que de la cantidad total de calcio recaptado propiamente dicha. Más aún, otros procesos que facilitan la salida del calcio desde el citosol, p.e. el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, podrían realizar vicariamente esta función (Langer y Peskoff, 1996). Ello sería posible sobre la base de una más lenta afectación de los mecanismos que mantienen el gradiente de sodio transsarcolémico. Es interesante destacar a este respecto que el

compartimento de calcio susceptible de ser intercambiado a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ no se ve alterado hasta transcurridos 50 min de inhibición metabólica en miocitos neonatales de rata, y ello a pesar de que las concentraciones celulares de ATP están 20 veces por debajo de las iniciales. Sin embargo, la contractilidad desaparece al cabo tan sólo de 2-3 min de inhibición metabólica (Barrigon *et al*, 1996).

4.- La velocidad de recaptación del calcio activador citosólico está disminuía ($< -dT/dt \text{ max}$) y la cantidad total de calcio recaptado en RS disminuye progresivamente ($< \text{TD}$). Inicialmente no se altera la velocidad de salida del calcio hacia miofilamentos (mantenimineto durante aprox. 1 minuto del $+dT/dt$, con disminución paralela de TD y máxima vel. de relajación). Pero cuando la disponibilidad de calcio en RS desciende de un nivel crítico (isquemia de más de 1 minuto, que compromete la disponibilidad de calcio en RS para ser liberado por unidad de tiempo), se desactiva la función aceleradora de contracción del RS, y la disipación de tensión desarrollada se correlaciona ya también con la disminución del $+dT/dt$.

- EFECTOS DEL CPA SOBRE PARAMETROS CONTRACTILES DE LA ISQUEMIA.

El efecto más destacable de la isquemia en septa pretratados con CPA 10^{-6} M es el retardo en la desaparición de la tensión desarrollada, de la máxima velocidad de contracción (con prolongación significativa de la meseta) y enlentecimiento también de la caída de la máxima velocidad de relajación (las dos fases de forma significativa) (Figuras 38 y 39). No se aprecia una modificación significativa de la tensión de reposo (no acúmulo de calcio libre en citoplasma). El hecho de que se tarde más tiempo en perder contractilidad durante la isquemia sin alterarse la tensión de reposo es una evidencia indirecta de que el estado metabólico se encuentra mejorado (Bourdillon y Poole-Wilson, 1982).

Por el contrario, la isquemia en los septa pretrados con CPA 10^{-5} M, tiene un comportamiento marcadamente distinto durante la fase inicial de la misma. En efecto, llama la atención la desaparición absoluta de la meseta inicial característica del $+dT/dt$ max, que presenta en su lugar una rápida caída inicial (Figura 22) que correlaciona, a su vez, con la del $-dT/dt$ max (Figura 40). En concordancia con este fenómeno, el acortamiento del t para el pico es menor que en la isquemia control (25 vs 37%), como también se acorta menos el t para el 90% de relajación medido desde el pico de contracción (7 vs 14 %). Todos estos fenómenos pueden explicarse de forma racional si aceptamos, como ya se describió con anterioridad, que el CPA a la concentración 10^{-5} M produce un

bloqueo completo de la SERCA. De este modo, la ausencia de un RS funcional traería consigo la falta del mecanismo responsable de mantener la velocidad de contracción máxima durante la fase inicial de la isquemia. Este hecho constituye, por tanto, un argumento más a favor de que el CPA empleado a la concentración mayor (10^{-5} M) produzca un bloqueo completo de la SERCA, e igualmente sostiene nuestra hipótesis del papel del RS como mantenedor de la velocidad de contracción durante casi el primer minuto de la isquemia.

Del mismo modo, el menor acortamiento del t para el 90% de relajación expresaría la ausencia de funcionalidad de la SERCA, de forma que la extrusión de Ca^{2+} debería realizarse a expensas del funcionamiento vicariante del intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ fundamentalmente.

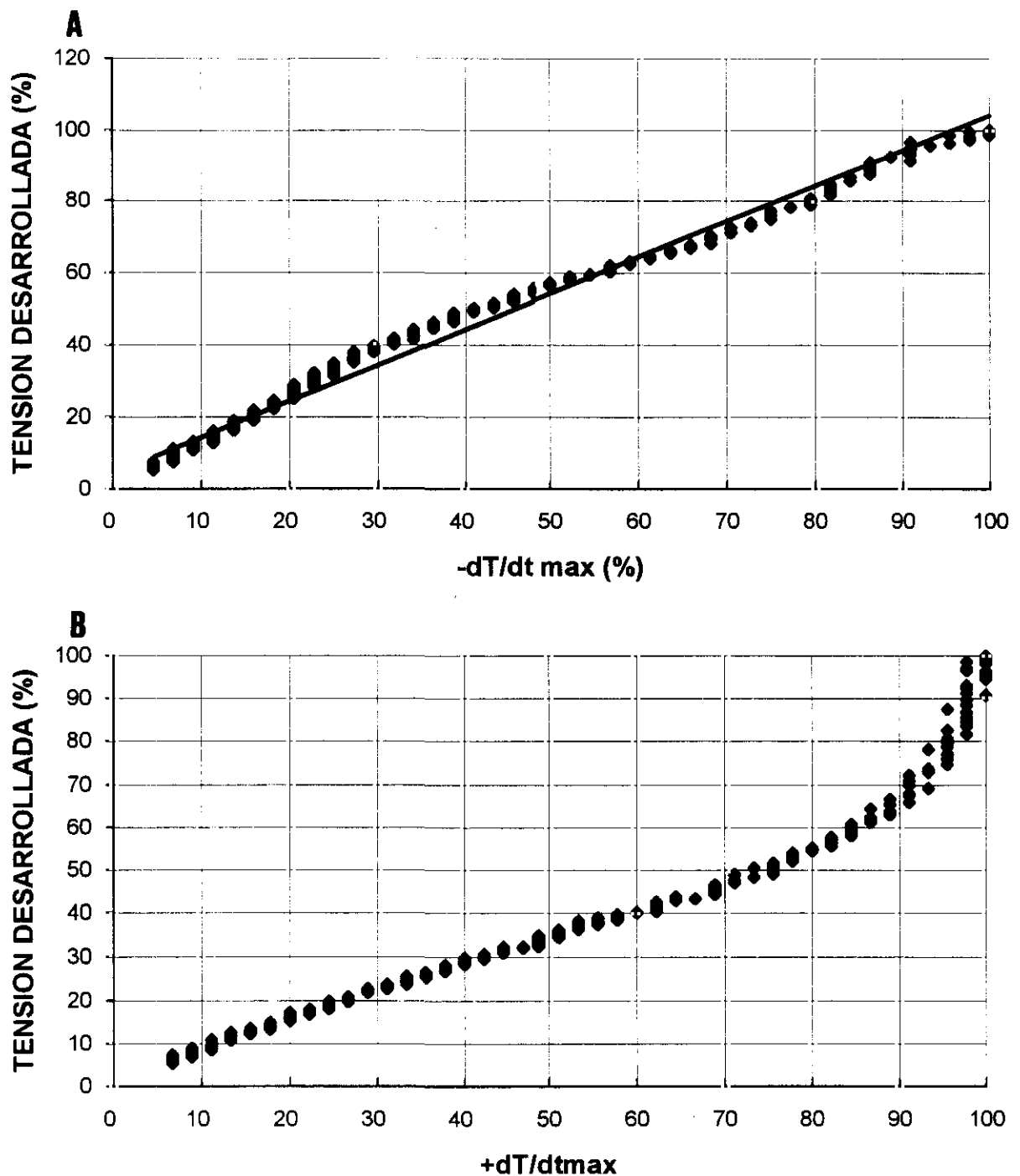


FIGURA 37.- Correlaciones normalizadas (%) entre tensión desarrollada y $\pm dT/dt$ max obtenidas sobre 381 contracciones desde el inicio de la isquemia en un experimento control típico. (A) La pendiente del ajuste lineal es casi 1 ($k=0,989$) y el coeficiente de correlación $r^2=0,98$. (B) La máxima velocidad de contracción presenta meseta inicial y sólo correlaciona con la TD en la fase lenta (pendiente $k=1,56$).

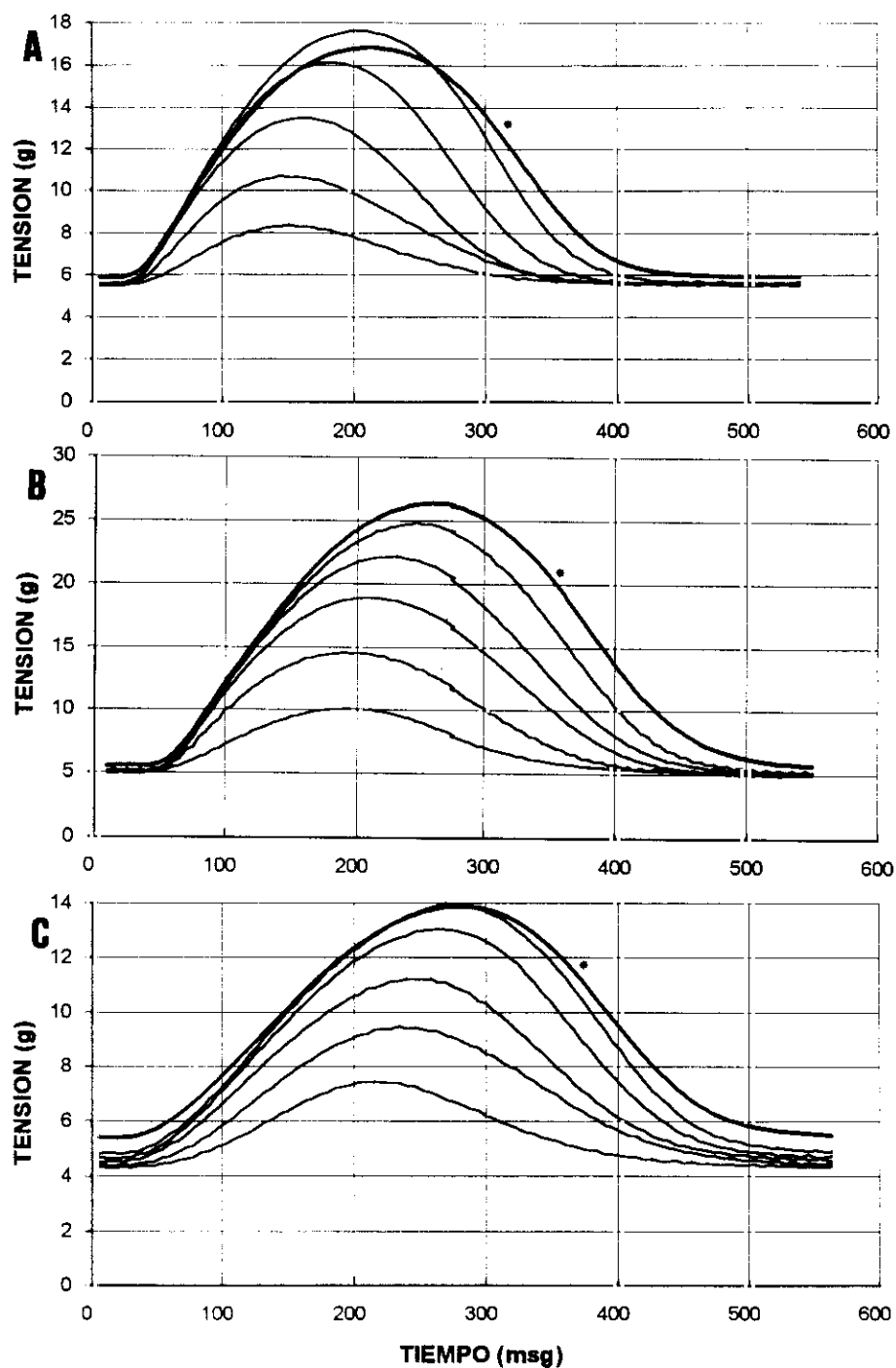


FIGURA 38.- Ejemplos típicos de caída de la contracción desde el momento preisquemia (asterisco) y a los 10, 20, 40, 80 y 120 sg (contracciones descendentes). Tomado de experimentos característicos del grupo control (A), pretratado con CPA 10^{-6} M (B) y con CPA 10^{-5} M (C). Es llamativo el menor desplazamiento hacia la izquierda del pico de contracción según aumenta el grado de bloqueo de la SERCA (B y C).

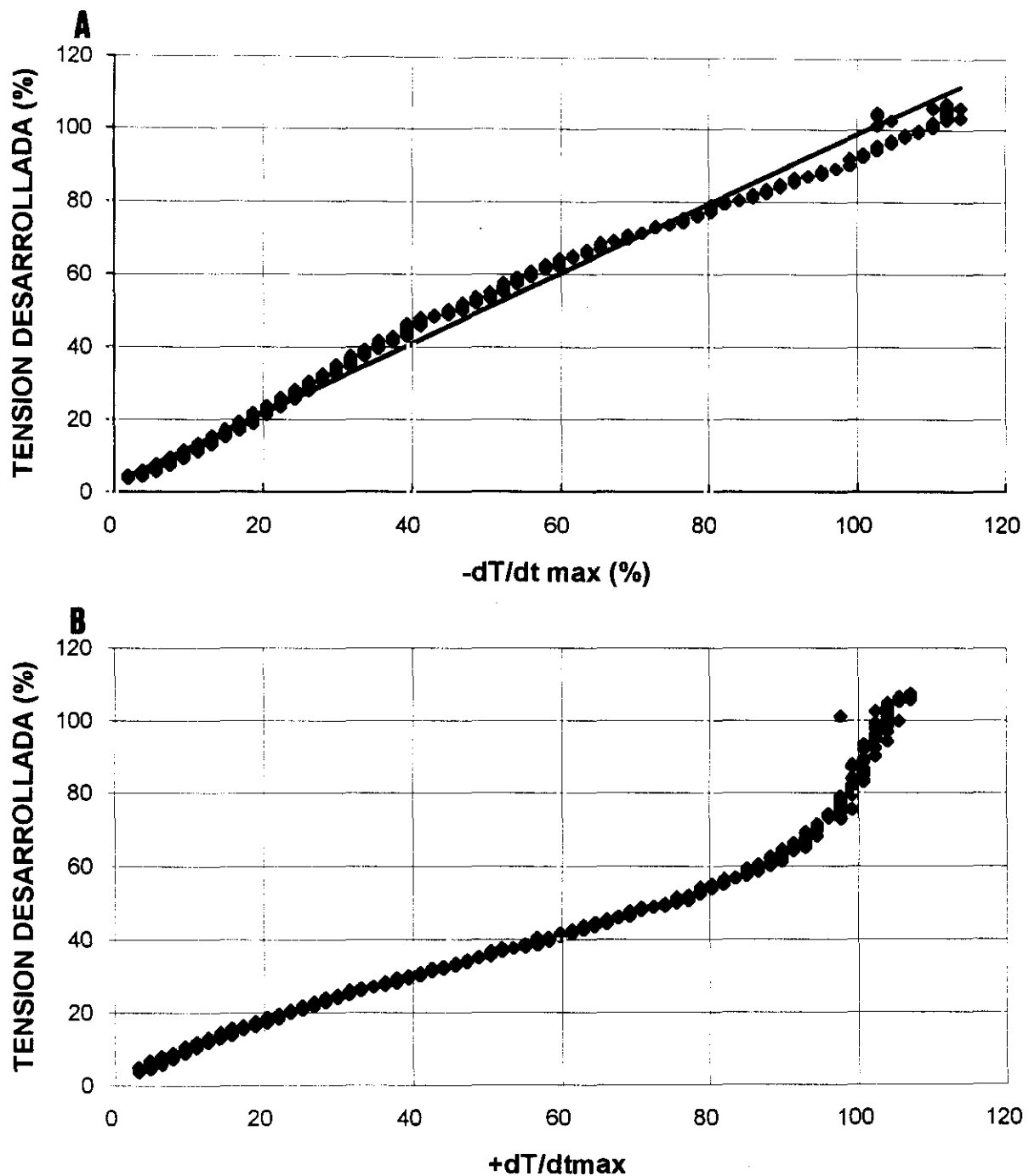


FIGURA 39.- Correlación normalizada (%) entre tensión desarrollada y \pm dT/dt max obtenida sobre 480 contracciones desde el inicio de la isquemia en un septum pretratado con CPA 10^{-6} M. La correlación es semejante en ambos casos a la isquemia control, con una pendiente de 1 para el ajuste lineal de (A).

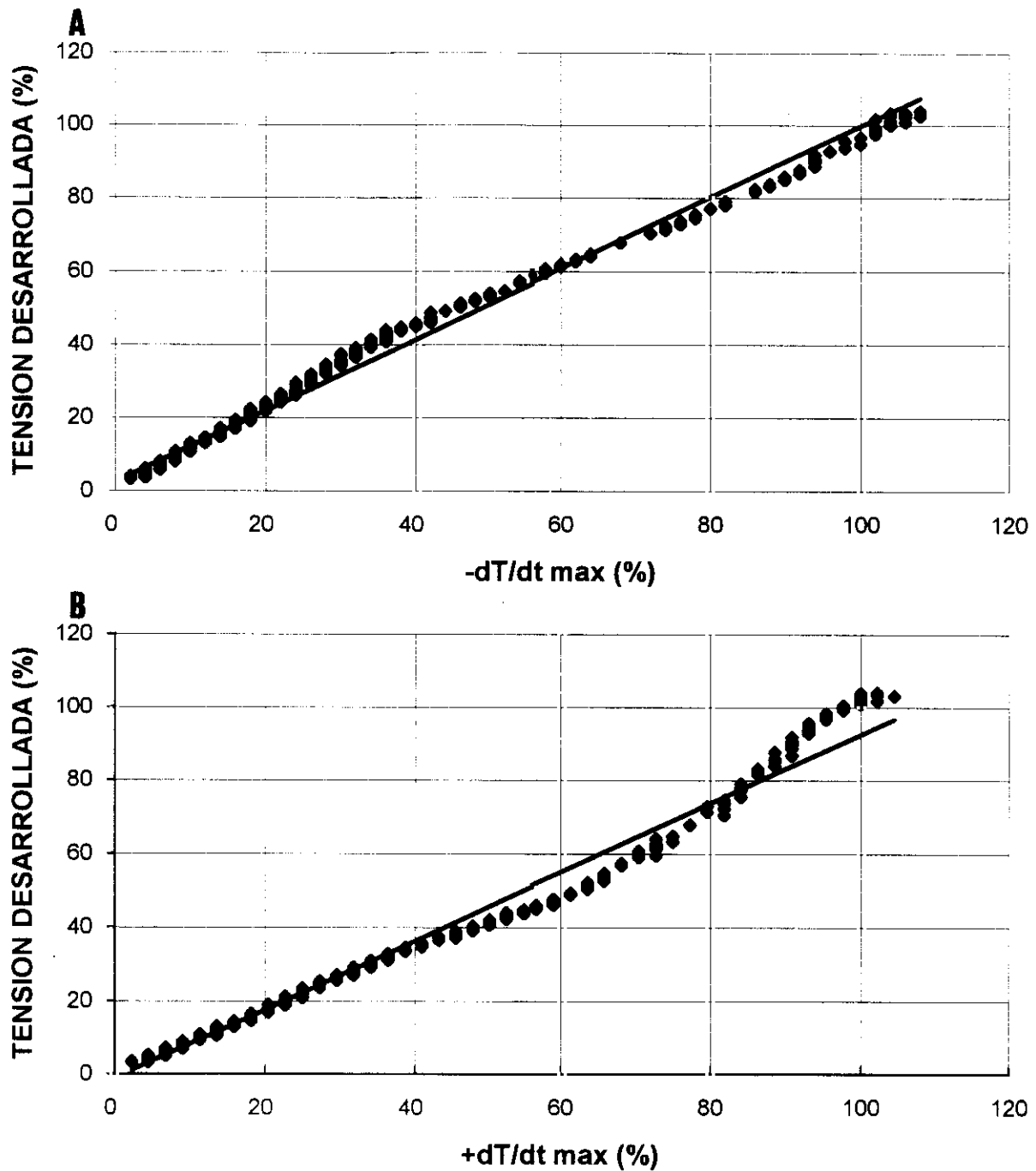


FIGURA 40.- Correlación normalizada entre tensión desarrollada y $\pm dT/dt$ max obtenida sobre 370 contracciones desde el inicio de la isquemia en un septum pretratado con CPA 10^{-5} M. Se mantiene la correlación lineal absoluta con el $-dT/dt$ max (A). Sin embargo, el comportamiento de la TD respecto al $+dT/dt$ max (B) tiene un comportamiento claramente diferente a los casos anteriores.

-EFECTOS CARDIOPROTECTORES DEL CPA.

El CPA ha demostrado tener efectos cardioprotectores frente a la isquemia de intensidad moderada tanto desde el punto de vista funcional, como bioquímico y morfológico. El único estudio en que se había analizado el efecto cardioprotector de este fármaco con anterioridad al nuestro valoraba protección frente a contusión miocárdica ("stunning") teniendo en cuenta tan solo parámetros funcionales (Du Toit y Opie, 1994). A este respecto, conviene recordar que la demostración de efectos antiisquémicos debe ponerse en relación con al menos dos de los parámetros señalados (Reimer y Jennings, 1986).

Si bien el eje del trabajo experimental ha girado en torno a la demostración exhaustiva de los efectos antiisquémicos del bloqueo de la SERCA con CPA respecto a parámetros contráctiles, los estudios de análisis de actividad de enzimas intracelulares en el líquido efluente tras la reperfusión, así como la descripción de la intensidad del daño celular valorado por un histopatólogo experto, han confirmado los resultados anteriores. En este punto, es lógico suponer que un menor daño celular con mayor integridad de membranas presente menor liberación de enzimas intracelulares. Sin embargo, llama la atención el hallazgo constante en las observaciones de microscopía electrónica de una casi perfecta preservación de las paredes capilares tras isquemia de 30 minutos y reperfusión en los tabiques bajo tratamiento con CPA. La acción protectora del CPA frente a isquemia-reperfusión en el endotelio

vascular no ha sido caracterizada hasta la fecha, y podría contribuir a la disminución del daño postreperusión. En cualquier caso, se trata de observaciones parciales que merecen más estudio.

El trabajo ya mencionado de Du Toit y Opie (1994) presenta diferencias metodológicas que hacen difícil la comparación de resultados. Así, estos autores trabajan sobre miocardio de rata, cuya dependencia contráctil del RS, es mayor que en el de conejo (más parecido en este sentido al humano) (Bassani *et al*, 1994). Estos autores encuentran relación dosis-dependiente en cuanto a los efectos cardioprotectores de tres concentraciones de CPA administrados antes de isquemia de corta duración (10^{-8} , 10^{-7} y 10^{-6} M). También encuentran un mismo rango de protección administrándolo exclusivamente durante la reperusión, por lo que concluyen que su principal mecanismo de acción puede radicar en evitar la sobrecarga de calcio, especialmente durante las fases iniciales de la reperusión. A este respecto, es interesante destacar que el Ca^{2+} del RS podría ser el principal responsable de la sobrecarga de Ca^{2+} durante las fases iniciales de la reperusión (Miller y Tormey, 1995).

Sin embargo, en esta tesis se demuestra que el efecto antiisquémico del CPA no guarda dosis-dependencia, y su mecanismo de acción no tiene que ver exclusivamente con una posible atenuación de la sobrecarga de Ca^{2+} intracitosólico durante la reperusión. En efecto, el mayor porcentaje de recuperación de contractilidad tras isquemia-reperusión (67,45%) se obtuvo con la concentración 10^{-6} M, mientras 10^{-5} M

recuperaba sólo un 52,35% respecto al valor basal de la preparación. Sin embargo, si se compara el porcentaje de recuperación respecto al valor de la tensión desarrollada inmediatamente antes de la isquemia (bajo la acción del fármaco, que disminuye de forma significativa la contractilidad; Tabla 7) el porcentaje de recuperación es del 63%, valor que no presenta diferencias estadísticamente significativas con la concentración menor. Además, no se puede afirmar que su mecanismo de acción radique exclusiva o fundamentalmente en evitar la sobrecarga intracitosólica de Ca^{2+} durante la reperfusión, ya que sus efectos antiisquémicos se ponen de manifiesto desde el inicio de la isquemia, como demuestran las constantes de tiempo de caída de los parámetros funcionales caracterizados en las figuras 21-25, y tabla 9. Es más, administrado exclusivamente durante la reperfusión, no manifiesta en absoluto ningún efecto cardioprotector, lo que contradice también los hallazgos de Du Toit y Opie (1994). Por todo ello, parece que la concentración menor de CPA, con un bloqueo parcial de la SERCA actuaría disminuyendo los transientes de calcio y mejorando el gasto energético celular. A este respecto, es interesante destacar que Du Toit y Opie encontraron unos niveles de fosfocreatina y ATP algo mayores en el grupo tratado con CPA en preisquemia. Por otra parte, la concentración mayor de CPA (10^{-5} M), si bien manifestaría efectos cardioprotectores evidentes disminuyendo la sobrecarga de calcio, puede disminuir el resultado de los mismos sobre contractilidad como consecuencia de la significativa repercusión sobre los parámetros contráctiles del bloqueo completo de la SERCA.

VI.- CONCLUSIONES

1.- El inhibidor específico de la SERCA, ácido ciclopiazónico (CPA), presenta efectos cardioprotectores frente a la isquemia experimental realizada en tabique interventricular de corazón de conejo. Este efecto se ha evidenciado sobre:

- **parámetros funcionales (porcentaje de recuperación de contractilidad tras 30 min de isquemia-reperfusión y máximo incremento de la tensión de reposo).**

- **parámetros bioquímicos (liberación en el líquido efluente de las enzimas intracelulares CPK, ASAT/GOT y LDH).**

- **observación directa en preparaciones de microscopía óptica y electrónica.**

2.- Este efecto cardioprotector ocurre por mecanismos que se desencadenan previamente a la inducción de la isquemia, puesto que la cardioprotección no ha sido evidente cuando este fármaco se perfundió únicamente durante la perfusión.

3.- CPA produce cardioprotección estadísticamente significativa en todo el rango de dosis estudiada, 10^{-6} , 10^{-5} y 3×10^{-5} M, pero sin que exista dosis-dependencia en la intensidad de su efecto antiisquémico, ya que la concentración menor fue la más efectiva, sin existir diferencias respecto a la cardioprotección entre las dos concentraciones mayores.

4.- CPA 10^{-6} M, produce un bloqueo parcial de la SERCA, ya que en el tabique interventricular no isquémico, tan sólo prolonga significativamente la fase de relajación del ciclo contráctil.

5.- Concentraciones mayores del CPA producen un bloqueo total de la SERCA ya que sus efectos sobre tabique no isquémico se evidencian más sobre la velocidad de contracción, lo que indica la ausencia de funcionalidad del retículo sarcoplásmico. El bloqueo es total puesto que la máxima concentración utilizada, 3×10^{-5} M, no incrementa los efectos de la concentración inmediatamente menor.

6.- Durante la isquemia sin tratamiento farmacológico, los mecanismos responsables de la desaparición de la tensión desarrollada y de los fenómenos de relajación son comunes en ambos procesos, como pone de manifiesto la estrecha correlación lineal y pendiente de 1, entre los valores normalizados de tensión desarrollada y $-dT/dt$ max a lo largo de la isquemia. Por el contrario, ello no ocurre con la $+dT/dt$ max, ya que ésta se mantiene inalterada durante 50 sg.

7.- La conservación de la máxima velocidad de contracción durante los 50 segundos iniciales de la isquemia está en relación con el mantenimiento de la actividad del retículo sarcoplásmico, ya que esto no ocurre cuando se bloquea totalmente la SERCA con las concentraciones mayores del CPA.

8.- Se postula que el mecanismo de acción antiisquémico del CPA 10^{-6} M guarda relación con una hipotética mejora de eficiencia en el gasto energético celular, ya que el pretratamiento con este fármaco y concentración produce durante la isquemia un enlentecimiento en la desaparición de la tensión desarrollada, de la máxima velocidad de contracción (con prolongación significativa de la meseta) y retardo también de la máxima velocidad de relajación.

9.- Se ha desarrollado y optimizado un sistema para el registro, medida y análisis automatizado de la contracción que permite por primera vez la correlación entre múltiples parámetros contráctiles tomados contracción a contracción. Se aportan los programas de ordenador desarrollados y el estudio de precisión y fiabilidad.

VII.- ANEXOS

ANEXO I.

Program SantosUno ;

uses Dos,Crt;

{ \$F+ }

{ \$L 812pgtpf }

type array_par=array[0..5] of integer;

array_datos=array[0..555] of integer;

var parm:array_par;

ary1,ary2:array_datos;

i,er,fun,size:integer;

BASE,start,stop:integer;

y,number:char;

fd : Text ;

f : file of integer;

gr,gm : Integer ;

color : Integer ;

b1,b2 ,

Barray : Byte ;

disp : Real ;

st : String ;

Function KbdActivo : Boolean ;

var

Regs : Registers;

Begin

FillChar(Regs,SizeOf(Regs),0);

Regs.AH := \$01;

Intr(\$16,Regs);

IF (Regs.Flags and \$40) = 0 THEN KbdActivo := True

Else KbdActivo := False ;

End;

Procedure LeeKbd ;

var

Regs : Registers;

Begin

FillChar(Regs,SizeOf(Regs),0);

Regs.AH := \$00;

Intr(\$16,Regs);

b1 := Regs.AH;

b2 := Regs.AL;

End;

Procedure pcl812(fun:integer;var a,b,c,d:integer);external;

Var

fm : byte ;

Nm : Byte ;
stfi : String ;
Graba : Byte ;
EstadoIni : Array[0..1] of Char ;
bi : Byte ;
Mi,Ms : Real ;
Frec : Real ;

Begin

ClrScr ;

Write('Periodo de muestreo (1 - 10 ms) '); readln(fm);

Write('Numero de muestras por ciclo '); readln(Nm);

Write('Fichero(sin extension) xxxxxxxx.BIN '); readln(stfi);

Graba := 0 ;

EstadoIni[0] := 'N';

EstadoIni[1] := 'G';

Assign(fd, stfi + '.dat');

Rewrite(fd);

Writeln(fd, ' Periodo de muestreo ', fm);

Writeln(fd, ' Numero de muestras ', Nm);

Assign(f, stfi + '.bin');

Rewrite(f);

```

BASE:=$220;
parm[0]:=BASE;
parm[1]:=5;
parm[2]:=1;
fun:=0;
pcl812 (fun,parm[0],ary1[0],ary2[0],er);
IF er < > 0 then
  begin
    writeln ( ' No se puede inicializar la tarjeta ');
    exit
  end;

parm[0]:=0;
parm[1]:=2;
fun:=23;
pcl812(fun,parm[0],ary1[0],ary2[0],er);
IF er < > 0 then
  begin
    writeln('No se puede fijar la ganancia ',er);
    exit
  end;

b1 := 0 ; b2 := 0 ;

Writeln('Calibracion');

```

Write('Nivel inferior, pulse INTRO '); readln;

Mi := 0 ; Ms := 0 ;

FOR i:= 1 to 200 DO

Begin

pcl812 (3,ary1[i],parm[0],ary2[0],er);

End;

FOR i:= 1 to 200 DO

Begin

Mi := Mi + ary1[i] ;

End;

mi := mi/200 ;

Writeln('Media inferior ', mi:4:2) ;

Writeln(fd,'Media inferior ', mi:4:2) ;

Write('Nivel superior, pulse INTRO '); readln;

FOR i:= 1 to 200 DO

Begin

pcl812 (3,ary1[i],parm[0],ary2[0],er);

End;

FOR i:= 1 to 200 DO

Begin

Ms := Ms + ary1[i] ;

End;

ms := ms/200 ;

Writeln('Media superior ', ms:4:2) ;

Writeln(fd,'Media superior ', ms:4:2) ;

Close(fd);

Writeln('Proceso de medida, pulse INTRO cuando este listo');

readln;

gr := 0 ;

IF kbdActivo THEN LeeKbd ;

bi := b1 ;

IF b1 = 68 then

Begin

Graba := 0;

b1 := bi ;

End

Else IF b1 = 67 then

Begin

Graba := 1;

b1 := bi ;

End;

Write(EstadoIni[Graba]);

Writeln(b1,' ',b2,' ',gr,')') ;

parm[0]:=200;

```

parm[1]:=fm*10;
fun:=17;
pcl812 (fun,parm[0],ary1[0],ary2[0],er);
IF er < > 0
  then
    begin
      writeln('Fallo en la fijacion de condiciones ');
      exit
    end;

```

```

parm[0] := 0 ;
parm[1] := 0 ;
fun := 1 ;
pcl812 (fun,parm[0],ary1[0],ary2[0],er);
IF er < > 0 then
  begin
    writeln('Fallo en selección de canal scan') ;
    exit
  end;

```

```

size := Nm;
parm[0]:=size;
parm[2]:=1;
fun:=4;

```

```
Until (Port[$226] and $1 = 1 ) ;
pcl812 (fun,parm[0],ary1[0],ary2[0],er);
IF er < > 0 then
begin
    writeln('No se puedo realizar la conversion ');
    exit
end;

i := b1 ;
IF Graba = 1 then
Begin
    inc(gr) ;
    Write(f,i);
    FOR i:=0 to size DO
    begin
        write(f,ary1[i]);
    end;
End;
until b2 = 27 ;
Close(f);
End.
```

ANEXO II.

Program SantosDos ;

uses CRT,Graph;

type

tipoin = Array[1..122] of integer ;

var

st : String ;

gr,gm,

fin,pipe,

res,k,tecla,punt,

i : Integer ;

v : Tipoin ;

fi : File ;

fs : Text ;

sino : Char;

sum, mus,

cent : Real ;

nom, sal : String ;

Begin

ClrScr;

Write('Nombre del fichero a convertir : _____ . BIN ');


```

readln(nom);
Write('Nombre del fichero convertido : _____ . PRN ');
readln(sal);
Write('Numero de puntos por contraccion : '); readln(punt);
Assign(fi, nom + '.bin');
Reset(fi,1);
Assign(fs, sal + '.prn');
Rewrite(fs);
k := 0 ;

BlockRead(fi,v,sizeof(v),res);
inc(k);
until EOF(fi);
Writeln('Nº de registros = ',k);
Write('Primer valor Convertido ');readln(i);
Write('Ultimo valor Convertido ');readln(fin);

gr:= VGA ; gm := 2 ;
Initgraph(gr,gm,'.bgi');
SetBkcolor(7);
SetColor(1);
str(i,st);
OuttextXY(10,50,'Primer valor '+st);
str(fin,st);
OuttextXY(10,70,'Ultimo valor '+st);

```

```
OuttextXY(450,50,'Fichero ' + nom + '.prn');
```

```
Rectangle(10,450,600,150);
```

```
SetColor(15);
```

```
fin := fin -i ;
```

```
Reset(fi,1);
```

```
k := 0 ;
```

```
IF i > 1 then
```

```
    BlockRead(fi,v,sizeof(v),res);
```

```
    inc(k);
```

```
until (k = i-1);
```

```
k := 0 ;
```

```
BlockRead(fi,v,sizeof(v),res);
```

```
    sum := -100000 ;
```

```
    mus := 100000 ;
```

```
FOR i := 1 to punt DO
```

```
Begin
```

```
    v[i] := -1 * v[i] ;
```

```
    write(fs,v[i], ' ');
```

```
    IF v[i] > sum THEN sum := v[i] ;
```

```
End;
```

```
FOR i := 2 to punt DO
```

```
Begin
```

```
    IF v[i] < mus THEN mus := v[i] ;
```

```
End;  
Writeln(fs);  
inc(k);  
cent := 500/fin ;  
tecla := v[1] ;  
IF tecla = -23 THEN SetColor(12)  
else IF tecla = -68 THEN SetColor(10) ;  
Line(50+trunc((cent)*k),400-trunc(mus/5),50+trunc((cent)*k),400-trun  
c(sum/5));  
until (EOF(fi) OR (k = fin));  
Close(fs);  
Close(fi);  
readln;  
CloseGraph;  
End.
```

ANEXO III.**Program SantosTres ;****Uses CRT,Graph;****Var****mn,sv : Array[1..150] of real ;****n,d,s,p,z : Array[1..150] of integer ;****t : Array[1..7] of Integer ;****bsl,nc,msc,misc : Array[1..10] of Real ;****sz : Array[1..22] of LongInt ;****txt : Array[1..7] of string ;****i,y,j,js,nsuav,nsuavf,gr,gm,gs,numf,****numl,numr,numb,numx,numz,numt,****maxn,devmaxamp,devminamp,npunt,ncal,pmr,fnl,xp,mindm,****minm,tminm,min,max,mind,maxd,maxdm,tmaxdm,tmindm,****maxm,tmaxm,basal,h,sx,k,inis,inre,WI,fnal : Integer ;****f,fs : Text ;****v,med,dev,w,emp,empc,fst,fmg, maxp : Real ;****st,wt : String ;****ch,visu,preca,si,xst : Char ;****Procedure LECTURA;****Begin****i:= 1 ;**

```

read(f,d[1]);
FOR i:= 2 to npunt DO read(f,d[i]);
readln(f);
inc(numl);
End;

```

Procedure SUAVIZADO;

Begin

```

FOR i := 3 to (npunt-1) DO s[i] := (d[i-1] + 2*d[i] + d[i+1]) DIV
4 ;
s[1] := d[1] ;
s[2] := d[2] ;
s[npunt] := d[npunt] ;
End;

```

Procedure INICONT;

Begin

```

numf := 0 ; numr := 0; si := 's' ;

```

```

read(f,d[1]) ;

```

```

readln(f) ;

```

```

inc(numr) ;

```

```

IF (d[1] = -23) AND (inis = 0) THEN inis := numr - 1

```

```

ELSE IF (d[1] = -19) AND (inre = 0)

```

```

THEN inre := numr-1

```

```

    ELSE IF (inre + 1 < inis) THEN inre := 0
    ELSE IF NOT (d[1] = -67) THEN si := 'n'
    ELSE IF (d[1] = -67) AND (si = 's') THEN inc(numf) ;
until EOF(f) ;
reset(f) ;
FOR i := 1 to 150 DO mn[i] := 0 ;
y := 0 ; j := 0 ;

    lectura ;
    suavizado ;
    FOR i := 1 to npunt DO mn[i] := mn[i] + s[i] ;
    inc(y) ;
until y = numf ;
End;

```

Procedure MAXIMO;

Begin

max := 0 ; i := 0 ;

while i < (npunt-1) DO

Begin

inc(i) ;

IF d[i] > max then

Begin

max := d[i] ;

t[1] := i ;

End

End;

End;

Procedure MEDCONT;

Begin

reset(f);

FOR i := 1 to 150 DO

Begin

mn[i] := 0 ;

sdv[i] := 0 ;

End;

y := 0 ; ncal := 0 ; numl := 0 ;

lectura ;

suavizado ;

FOR i := 1 to npunt DO d[i] := s[i] ;

maximo ;

IF (t[1] > tmaxm - 4) AND (t[1] < tmaxm + 4) then

Begin

ncal := ncal + 1 ;

FOR i := 1 to npunt DO

Begin

w := d[i] ;

mn[i] := mn[i] + w ;

```

        sdv[i]:= sdv[i] + SQR(w) ;
    End;

    End;

    inc(y) ;
until y = numf ;
i := 1 ;

w := mn[i] ;
sdv[i] := SQR((sdv[i] - SQR(w) / ncal) /
              (ncal - 1)) * 100 ;
mn[i] := w / ncal ;
inc(i) ;
until i = npunt ;
FOR i := 1 to npunt DO
    Begin
        d[i] := ROUND(mn[i]) ;
        s[i] := ROUND(mn[i] + ((2 * sdv[i]) / 100)) ;
    End;
End;

```

Procedure INIMIN;

```

Begin
    min := 16000 ; med := 0 ; dev := 0 ;
    emp := 0 ; empc := 0 ; numz := 1;

```



```

w := d[i] ;
emp := emp + w ;
empc := empc + SQR(w) ;
med := emp / numz ;
IF (numz > 2) THEN dev := SQR((empc - SQR(emp) /
numz) / (numz-1));
IF pmr > 0 THEN dec(i) ELSE inc(i) ;
inc(numz) ;
until (((pmr = 0) AND (d[i] > med + dev)) OR
((pmr > 0) AND (d[i] > med + dev)) AND (dev > 0)) OR
((numz = npunt-1) OR (i = 0));
min := ROUND(med) ;
IF pmr = 0 THEN basal := min ELSE fnal := min ;
IF i = npunt THEN i := 00 ;
IF pmr > 0 THEN FOR j := 2 to npunt DO n[j] := d[j] ;
IF pmr = 0 THEN pmr := i ELSE fnl := npunt-(numz+1) ;
End;

```

Procedure DOBLEZ;

Begin

i := t[1] ;

inc(i);

until (d[i] > med + (4 * dev)) OR (i=npunt) ;

IF (i > fnl) THEN preca := 's' ;

End;

Procedure EXTRASIST;

Begin

IF NOT (numt = d[1]) THEN k := 0 ;

numt := d[1] ;

IF (k < 9) THEN k := k + 1 ;

bsl[k] := basal ; nc[k] := pmr ;

mxk[k] := max ; mixc[k] := fnal ;

bsl[10] := 0 ; nc[10] := 0 ; mxk[10] := 0 ; mixc[10] := 0 ;

FOR i := 1 to 8 DO

Begin

bsl[10] := bsl[10] + bsl[i] ;

nc[10] := nc[10] + nc[i] ;

mxk[10] := mxk[10] + mxk[i] ;

mixc[10] := mixc[10] + mixc[i] ;

End;

IF (k > 8) AND (d[1] = -19) THEN

IF ((mixc[9]/(mixc[10] / 8)) > 1.2)

OR ((bsl[9] / (bsl[10] / 8)) > 1.2)

OR ((mxk[9] / (mxk[10] / 8)) > 1.3) THEN Xst := 's' ;

IF (k > 8) AND NOT (d[1] = -19) THEN

IF ((bsl[9] / (bsl[10] / 8)) > 1.1)

OR (nc[9] > nc[10] / 8 + 3)

OR ((mxk[9] / (mxk[10] / 8)) > 1.04)

```

    OR ((mixc[9] / (mixc[10] / 8)) > 1.2) THEN Xst := 's';
IF (k>8) AND NOT (Xst = 's') then
  FOR i := 1 to 8 DO
    Begin
      bsl[i] := bsl[i+1] ;
      nc[i] := nc[i+1] ;
      mxc[i] := mxc[i+1] ;
      mixc[i]:=mixc[i+1] ;
    End;
  End;
End;

```

Procedure MEDIDA1;

```

  Begin
    i := 2 ;

    inc(i);
    until (d[i] > ((max-basal) div 2) + basal) OR
      (i = npunt-1) ;
    t[2] := i ;
    IF (((max-basal) div 2) + basal) -d[i-1]) <
      d[i] - (((max-basal) div 2) + basal) THEN t[2] := i-1 ;
    i := t[1];

    inc(i);
    until (d[i] < ((max-basal) div 10) + basal) OR

```

```

        (i = npunt-1) ;
t[3] := i ;
IF d[i-1]- (((max - basal) div 10) + basal) <
    (((max - basal) div 10) + basal) -d[i] THEN t[3] := i-1;
End;

```

Procedure MEDIDA2;

```

Begin
    maxd := 0 ;
    FOR i:= 2 to t[1] DO
        Begin
            IF p[i] > maxd then
                Begin
                    maxd := p[i] ;
                    t[4] := i ;
                End;
            End;
        End;
    mind := 10000;
    FOR i:= t[1] to (npunt-1) DO
        Begin
            IF p[i] < mind then
                Begin
                    mind := p[i] ;
                    t[5] := i ;
                End;
            End;
        End;
    End;

```

End;

End;

Procedure GRAF1;

Begin

SetLineStyle(0,1,1) ; h := 1 ; sx := 51 ;

IF gs = 0 THEN j := 2 ELSE j := 1 ;

IF gs = 0 THEN xp := maxm ELSE xp := maxdm ;

IF (Xst = 'n') OR ((Xst = 's') AND (sx = 51)) then

Begin

WHILE (h < 3) DO

Begin

IF (h = 2) AND NOT ((GetColor = 7) OR

(Xst = 's')) THEN sx := 346;

v:= (p[2] /xp) ; v := v*(90*j) ;

IF (sx = 346) AND (d[1] = -19) AND NOT

(si = 's') THEN SetColor(1);

IF (SX=346) AND (d[1]=-23) AND NOT

(si = 's') THEN SETCOLOR(3) ;

MoveTo(sx, (200+gs)-ROUND(v)) ;

IF (numl < inis) and (sx=346) AND NOT

(si='s') and not (d[1]=-67) THEN SetColor(5) ;

FOR i:= 2 to (npunt-1) DO

Begin

v := p[i] / xp ; v := v * (90*j) ;

```

IF NOT ((ROUND(v) > 190) OR
      (ROUND(v) < -140 )) then
      LineTo(sx+i*2, (200+gs)-trunc(v)) ;
End;
      h := h + 1 ;
End;
End;
End;

```

Procedure Suader;

```

Begin
      FOR i:= 3 to (npunt-1) DO
          s[i] := (p[i-1] + 2*p[i] + p[i+1]) div 4;
      s[1] := p[1];
      s[2] := p[2];
      s[npunt] := p[npunt];
End;

```

Procedure GRAF2;

```

Begin
      SetLineStyle(Dottedln,10,1) ;
      FOR i := 1 to 7 DO
          Begin
              Line(60 + t[i]*2,20,60 + t[i]*2,400) ;
          End
      End

```

```

    IF (i mod 2 > 0) OR (i = 2) then
        OutTextXY(50+t[i]*2,410,'t'+CHR(i+$30))
        ELSE OutTextXY(50+t[i]*2,420,'t'+CHR(i+$30)) ;
    End;
FOR i := 1 to 7 DO
    Begin
        STR(t[i],wt) ;
        OutTextXY(555,20+20*i,wt) ;
        IF (i < 6) THEN STR(n[t[i]],wt)
        ELSE STR(p[t[i]],wt) ;
        OutTextXY(585,20+20*i,wt) ;
    End ;
End;

Procedure FINAL;
Begin
    CloseGraph ;
    Close(f) ;
    Close(fs) ;
    Halt ;
End ;

BEGIN
    ClrScr ;

```

```

numb := 0 ; numl := 0 ; k := 0 ; inis := 0; inre := 0 ;
numx := 1; pmr := 0; numr := 1 ; j := 0 ; minm := 0 ;
maxd := 0 ; nsuav := 0; nsuavf := 1 ; preca := 'n' ;
ch := 'd' ;
gr := VGA ; gm := 2 ;
Write('Fichero          '); readln(st);
Write('Frecuencia de estimulacion (Hz) ? '); readln(fst) ;
Write('Nº de puntos por contraccion ? '); readln(npunt) ;
Write('Desea visualizacion manual ("s/n") ? ');
readln(visu) ;
IF visu = 's' THEN
    Begin
        Write('Nº de contracción de partida (0...n) ? ');
        readln(numb) ;
    End;
Assign(f,'c:\tp\' + st + '.prn');
Reset(f);
fst := 1 / fst ;
INICONT;
MAXIMO;
tmaxm := t[1] ;
d[1] := 0 ; d[2] := 0 ;
FOR i := 3 to npunt DO d[i] :=
ROUND((mn[i]/numf)-(mn[i-1]/numf)) ;
MAXIMO ;

```



```

FOR i := 1 to npunt DO z[i] := d[i] ;
tmaxdm := t[1] ;
maxdm := d[t[1]] ;
FOR i := 2 to npunt DO d[i] := d[i] * -1 ;
MAXIMO ;
mindm := d[t[1]] ;
tmindm := t[1] ;
FOR i := 1 to npunt DO d[i] := ROUND(mn[i]/numf) ;
MAXIMO;
maxm := d[t[1]] ;
tmaxm := t[1] ;
i := 2;
INIMIN;
minm := basal ;
i := npunt;
INIMIN;
MEDCONT;
d[npunt] := d[npunt-1] ;
SUAVIZADO ;
FOR j := 1 to nsuavf DO
  Begin
    FOR xp := 2 to npunt DO
      Begin
        d[xp] := s[xp] ;
        Suavizado ;

```

```

    End;

    FOR i := 1 to npunt DO mn[i] := d[i] ;

    End;

numl := numb ;

reset(f) ;

IF NOT (numl = 0) then

    Begin

        FOR i := 1 to numl - 5 DO readln(f)

        End ;

    numt := -67 ;

    Assign(fs,'c:\tp\' + st + '.res');

    Rewrite(fs);

    Initgraph(gr,gm,'');

    ClearDevice ;

    SetBkColor(7) ; SetColor(15);

    SetTextStyle(1,0,1) ; OuttextXY(40,425,'Fichero: ' + st) ;

    STR(numf,wt) ; OutTextXY(40,450,'nº controles = ' + wt );

    OutTextXY(250,425,'Contraccion nº ') ;

    SetTextStyle(2,0,7); SetUserCharSize(4,5,4,5) ;

    Line(50,20,50,200) ; Line(50,200,300,200) ;

    Line(50,220,50,400) ; Line(50,300,300,300) ;

    SetColor(1) ;

    Rectangle(2,2,638,478) ; Rectangle(6,6,634,474) ;

    IF (visu = 's') OR (visu = 'S') then

        Begin

```

```

SetColor(8) ;

SetTextJustify(0,1) ; SetLineStyle(0,1,1) ;

FOR i:= 1 to 8 DO line(440,10+20*i,620,10+20*i) ;

Rectangle(437,27,623,173) ;

Rectangle(440,30,620,170) ;

FOR i := 1 to 2 DO line(510+20*i,30,510+20*i,170) ;

Line(580,30,580,170) ;

txt[1] := 'Max Cont.' ; txt[2] := '50% Cont.' ;

    txt[3] := '90% Rel' ; txt[4] := 'Max.1a D.' ;

    txt[5] := 'Min.1a D.' ; txt[6] := '% +dT/dt' ;

    txt[7] := '% -dT/dt' ;

FOR i := 1 to 7 DO OutTextXY(445,20+20*i,txt[i]) ;

FOR i := 1 to 5 DO

OutTextXY(532,20+20*i,'t'+CHR(i+$30)) ;

End ;

SetColor(15) ;

IF NOT ((visu = 's') OR (visu = 'S')) then

Begin

    Line(345,20,345,205) ; Line(340,200,620,200) ;

    Line(345,220,345,405) ; Line(340,300,620,300) ;

End;

Xst := 'n' ; si := 's' ; pmr := 0;

SetColor(15) ; SetLineStyle(0,1,1) ;

Line(45,200,300,200) ; Line(45,300,300,300) ;

```

```

STR(numl+1,wt) ; OutTextXY(375,425,wt) ;
SetColor(4);
IF (numl=inis) THEN
    OutTextXY(250,450,'t de isquemia (seg) =');
FOR i := 2 to npunt DO p[i] := ROUND(mn[i]) ;
IF (numl > numb + 1) THEN GRAF1 ;
si := 'n' ;
FOR i:= 1 to 150 DO
    Begin
        d[i] := 0 ; s[i] := 0 ; p[i] := 0 ; n[i] := 0 ;
    End;
LECTURA;
i := 2;
INIMIN;
i := npunt;
INIMIN;
IF numx = 1 THEN DOBLEZ;
IF preca = 's' THEN fst := fst * 2 ;
MAXIMO;
maxp := (max-basal) / (maxm-minm) ;
IF (numx>inis) AND (maxp < 0.5) then
    Begin
        nsuavf := ROUND((0.6 -maxp)*10) ;
        nsuav := nsuavf - 1 ;
    End;

```

```

IF (d[1] = -23) then
    Begin
        WI := ROUND((numl-inis)*fst) ;
        STR(WI,wt) ;
        OutTextXY(425,450,wt) ;
    End;
    gs := 0 ;
    n[1] := ROUND(mn[2]) ;
EXTRASIST;
SUAVIZADO;
    SetColor(1);
    FOR j:= 0 to nsuavf DO
        Begin
            FOR i:= 2 to npunt DO d[i] := s[i];
            Suavizado;
        End ;
    SetColor(14) ;
    p[1] := d[1] ;
    p[npunt] := p[npunt-1] ;
    FOR i := 2 to npunt DO p[i] := d[i] ;
GRAF1 ;

MAXIMO;
    pmr := 0 ;
    i := 2 ;

```

```

INIMIN ;
i := npunt ;
INIMIN ;
MEDIDA1;
  FOR i := 1 to npunt DO n[i] := p[i] ;
  gs := 100 ;
  SetColor(4); si := 's' ;
  FOR i := 1 to npunt DO p[i] := z[i] ;
GRAF1 ;
  maxd := 0 ; si:='n' ;
  mind := 16000;
  FOR i:= 3 to (npunt-2) DO
    Begin
      p[i] := d[i] - d[i-1];
      IF p[i] > maxd THEN maxd := p[i];
      IF p[i] < mind THEN mind := p[i];
    End;

  SetColor(1);
  IF nsuav > 0 then
    Begin
      FOR j:= 1 to nsuav DO
        Begin
          Suader;
          FOR i:= 2 to npunt DO p[i] := s[i] ;

```

```

    End;
    SetColor(14) ;
    p[1] := d[1] ;
    End;
MEDIDA2;
GRAF1;

    IF NOT ((visu='S') OR (visu='s')) THEN delay(100) ;
    IF (numl=inis) OR (numl=inre) THEN delay(20000) ;

SETCOLOR(7);

    IF (numx = numr) THEN ch := readkey ;
    IF NOT (numl=inis-1) OR (numl=inre-1) THEN GRAF1;
    SetColor(8);
    IF (visu='s') OR (visu='S') THEN GRAF2;
    SetColor(7) ;
    IF NOT (numl= numr) OR (numl=inis) OR (numl=inre) then
        Begin
            SetColor(7) ;
            STR(numl,wt) ; OutTextXY(375,425,wt) ;
            STR(WI,wt) ; OutTextXY(425,450,wt) ;
            IF (numl = inre) then
                OutTextXY(250,450,'t de isquemia (seg) = ') ;
            FOR i := 1 to npunt DO p[i] := n[i] ;
            gs := 0 ;

```

```

GRAF1;

End;

IF ((visu='s') OR (visu='S')) THEN GRAF2 ;
n[t[1]] := n[t[1]] - basal ;
IF (n[t[1]]-basal)>0 then
Begin
    devmaxamp := round(((n[t[4]]-basal)/(n[t[1]]-basal))*100) ;
    devminamp := round(((n[t[5]]-basal)/(n[t[1]]-basal))*100) ;
End;
IF NOT (Xst = 's') THEN
Begin
    Write(fs,numx,' ',d[1],' ',basal,' ',pmr,' ');
    FOR i:= 1 to 3 DO Write(fs,t[i],' ',n[t[i]],' ');
    FOR i:= 4 to 5 DO Write(fs,t[i],' ',p[t[i]],' ');
    Write(fs,devmaxamp,' ',devminamp,' ');
    Writeln(fs);
End ;

IF (visu='s') OR (visu='S') THEN ch := readkey;
IF ( ch = 'f' ) OR ( ch = 'F' ) THEN Final ;
IF (preca = 's') THEN numx:= numx + 2 ELSE numx:= numx + 1
;
UNTIL EOF(f);
FINAL;
End.

```


VIII.- BIBLIOGRAFIA

- Agata N, Tanaka H & Shigenobu K. Possible action of cyclopiazonic acid on myocardial sarcoplasmic reticulum: inotropic effects on neonatal and adult rat heart. *Br J Pharmacol* 1993; 108: 571-572.

- Allen DG, Lee JA & Smith GL. The consequences of simulated ischemia on intracellular Ca^{2+} and tension in isolated ferret ventricular muscle. *J Physiol (Lond)* 1989; 410: 297-323.

- Ardehali A & Ports TA. Myocardial oxygen supply and demand. *Chest* 1990; 98: 699-705.

- Backx PH, Gao W-D, Azan-Backx MD & Marban E. Force and intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ in intact rat cardiac trabeculae. *J Gen Physiol* 1995; 105:1-19.

- Badaoui A, Huchet-Cadiou C & Léoty C. Effects of cyclopiazonic acid on membrane currents, contraction and intracellular calcium transients in frog heart. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 2495-2505.

- Barrigón S, Wang S-Y, Ji X & Langer GA. Characterization of the calcium overload in cultured neonatal rat cardiomyocytes under metabolic inhibition. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28, 1329-1337.

- Barry WH & Bridge JHB. Intracellular calcium homeostasis in cardiac myocytes. *Circulation* 1993; 87: 1806-1815.

- Barry WH, Rasmussen CAF Jr, Ishida H & Bridge JHB. External Na-independent Ca extrusion in cultured ventricular cells. *J Gen Physiol* 1985; 88: 394-411.

- Bassani JWM, Bassani RA & Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. J Physiol (Lond) 1994; 476: 279-293,

- Baudet S, Shaoulian R & Bers DM. Effects of thapsigargin and cyclopiazonic acid on twitch force and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content of rabbit ventricular muscle. Circ Res 1993; 73: 813-819.

- Benzi RH & Lerch R. Dissociation between contractile function and oxidative metabolism in postischaemic myocardium. Attenuation by ruthenium red administration during reperfusion. Circ Res 1992; 71: 567-576.

- Bers DM. Ca^{2+} influx and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in cardiac muscle activation during post rest recovery. Am J Physiol 1985; 248: H366-H381.

- Bers DM, Bridge JHB & MacLeod KT. The mechanisms of ryanodine action in rabbit cardiac muscle evaluated with Ca^{2+} -sensitive microelectrodes and rapid cooling contractures. Can J Physiol Pharmacol 1987; 65: 610-618.

- Bers DM, Philipson KD & Langer GA. Cardiac contractility and sarcolemmal calcium binding in several cardiac muscles preparations. Am J Physiol 1981; 240: H576-H583.

- Beuckelmann DJ & Wier WG. Mechanism of release of calcium from sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells. *J Physiol (Lond)* 1988; 405: 233-255.

- Blanchard EM & Solaro RJ. Inhibition of the activation and troponin calcium binding of dog cardiac myofibrils by acidic pH. *Circ Res* 1984; 55: 382-391.

- Block BA, Imagawa T, Campbell KP & Franzini-Armstrong C. Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J Cell Biol* 1988; 107: 2857-2600.

- Borgatta L, Watras J, Katz AM & Ehrlich BE. Regional differences in calcium release channel from heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2486-2487.

- Bourdillon PD & Poole-Wilson PA. Effects of ischemia and reperfusion on calcium exchange and mechanical function in isolated rabbit myocardium. *Cardiovasc Res* 1981; 15: 121-130.

- Bourdillon PD & Poole-Wilson PA. The effects of verapamil, quiescence, and cardioplegia on calcium exchange and mechanical function in ischemic rabbit myocardium. *Circ Res* 1982; 50: 360-368.

- Braunwald E & Kloner RA. The stunned myocardium: Prolonged postischemic dysfunction. Circulation 1982; 66: 1146-1149.

- Braunwald E & Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword ?. J Clin Invest 1985; 76: 1713-1719.

- Camici P, Marraccini P, Lorenzoni R, Ferrannini E, Buzzigoli G, Marzilli M & L'Abbate A. Metabolic markers of stress-induced myocardial ischemia. Circulation 1991; 83: III8-13.

- Cannell MB. Contribution of sodium-calcium exchange to calcium regulation in cardiac muscle. Ann N Y Acad Sci 1991; 639: 428-443.

- Carafoli E. The Ca^{2+} pump of the plasma membrane. J Biol Chem 1992; 267: 2115-2118.

- Caroni P & Carfoli E. An ATP-dependent calcium pumping system in dog heart sarcolemma. Nature 1980; 283: 765-767.

- Caroni P, Zurini M, Clark A & Carafoli E. Further characterization and reconstitution of the purified Ca^{2+} -pumping ATPase of heart sarcolemma. J Biol Chem 1983; 258: 7305-7310.

- Cascio WE, Yan GX & Kleber AG. Passive electrical properties, mechanical activity and extracellular potassium in arterially perfused and

ischemic rabbit ventricular muscle: effects of calcium entry blockade or hypocalcemia. Circ Res 1990; 66: 1461-1473.

- Chiesi M, Wrzosek A & Grueninger S. The role of the sarcoplasmic reticulum in various types of cardiomyocytes. Mol Cell Biochem 1994; 130: 159-171.

- Cinca Cuscullola J. Bases fisiopatológicas de las arritmias de la isquemia y reperfusión coronaria. Rev Esp Cardiol 1988; 41: 244-253.

- Cobbe SM & Poole-Wilson PA. The time of onset and severity of acidosis in myocardial ischemia. J Mol Cell Cardiol 1980; 12: 745-760.

- Cole WC, McPherson CD & Sontag D. ATP-regulated K^+ channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. Circ Res 1991; 69: 571-581.

- Coulombe A, Lefèvre IA, Baro I & Coraboeuf E. Barium- and calcium-permeable channels open at negative membrane potentials in rat ventricular myocytes. J Membr Biol 1989; 111: 57-67.

- Crompton M. The role of Ca^{2+} in the function and dysfunction of heart mitochondria. En: Calcium and the Heart. G.A. Langer (ed). Raven Press. New York, 1990; pp 167-198.

- Currie RW, Karmazyn M, Kloc M & Mailer K. Heat-shock response is associate with enhanced postischemic ventricular recovery. *Circ Res* 1988; 63: 543-549.

- De la Bastie D, Levitsky D, Rappaport L, Mercadier JJ, Marotte T, Wisnewsky C, Brovkovich V, Schwartz K & Lompré AM. Function of the sarcoplasmic reticulum and expression of its Ca^{2+} -ATPase gene in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Circ Res* 1990; 66: 554-564.

- Du Toit EF & Opie LH. Inhibitors of Ca^{2+} -ATPase pump of sarcoplasmic reticulum attenuate reperfusion stunning in isolated rat heart. *J Cardiovas Pharmacol* 1994; 24: 678-684.

- Engler R & Gilpin E. Can superoxide dismutase alter myocardial infarct size ?. *Circulation* 1989; 79: 1137-1142.

- Fabiato A. Calcium-induced calcium release from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 1983; 245: C1-C14.

- Fabiato A. Appraisal of the physiological relevance of two hypotheses of the mechanism of Ca^{2+} release from the cardiac sarcoplasmic reticulum: Calcium-induced release versus charged coupled release. *Mol Cell Biochem* 1989; 89: 135-143.

- Fabiato A & Fabiato F. Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol (Lond)* 1975; 249: 469-495.

- Fabiato A & Fabiato F. Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rat and frog hearts and from fetal and newborn rat ventricles. *Ann N Y Acad Sci* 1978; 307: 491-522.

- Feldman AM, Weinberg EO, Ray PE & Lorell BH. Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. *Circ Res* 1993; 73: 184-192.

- Fujii J, Ueno A, Kitano A, Tanaka S, Kadoma M & Tada M. Complete complementary DNA-derived aminoacid sequence of canine cardiac phospholamban. *J Clin Invest* 1987; 79: 301-304.

- Fukuhara T. Histochemical, ultrastructural and cytochemical study of reperfusion effect on ischemic myocardial injury. *Jpn Circ J* 1985; 49: 432-445.

- Fuster V, Badimón L, Badimón JY & Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. First of two parts. *N Engl J Med* 1992; 326: 242-250. (a)

- Fuster V, Badimón L, Badimón JY & Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. Second of two parts. *N Engl J Med* 1992; 326: 310-318. (b)
- Ganote CE. Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol* 1983; 15: 67-73.
- García-Dorado D, Theroux P, Duran JM, Solares J, Alonso J, Sanz E, Muñoz E, Elizaga J, Botas J, Fernández-Avilés F, *et al.* Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation* 1992; 85: 1160-1174.
- Goeger DE & Riley RT. Interaction of cyclopiazonic acid with rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. Effect on Ca^{2+} binding and Ca^{2+} permeability. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 3995-4003.
- Grinwald PM. Calcium uptake during post-ischemic reperfusion in the isolated rat heart: Influence of extracellular sodium. *J Mol Cell Cardiol* 1984; 16: 795-801.
- Gross GJ & Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circulation* 1992; 90: 223-233.

- Gruber W. Inhibition of creatine kinase activity by Ca^{2+} and reversibility effect of ethylenediaminetetraacetate. Clin Chem 1978; 24: 177-178.

- Gunter TE, Gunter KK, Sheu S-S & Gavin CE. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. Am J Physiol 1994; 267: C313-C339.

- Gwathmey JK, Hajjar RJ & Solaro RJ. Contractile deactivation and uncoupling of crossbridges. Effects of 2,3-butanedione monoxime on mammalian myocardium. Circ Res 1991; 69: 1280-1292.

- Haworth RA, Goknur AB, Hunter DR, Hegge JO & Berkoff HA. Inhibition of Ca influx in isolated adult rat hearts cells by ATP depletion. Circ Res 1987; 60:586-594.

- Haworth RA & Hunter DR. Allosteric inhibition of the Ca^{2+} activated hydrophilic channel of the mitochondrial inner membrane by nucleotides. J Membr Biol 1980; 54: 231-236.

- Hearse DJ, Humphrey SM & Bullock GR. The oxygen paradox and the calcium paradox: Two facets of the same problem ?. J Mol Cell Cardiol 1978; 10: 641-668.

- Hearse DJ, Humphrey SM & Chain EB. Abrupt reoxygenation of

the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. J Mol Cell Cardiol 1973; 5: 395-407.

- Henry TD, Archer SL, Nelson D, Weir EK & From AHL. Postischemic oxygen radical production varies with duration of ischemia. Am J Physiol 1993; 264: H1478-H1484.

- Henry PD, Schuchleib R, Davis J, Weiss ES & Sobel BE. Myocardial contracture and accumulation of mitochondrial calcium in ischemic rabbit heart. Am J Physiol 1977; 233: H677-H684.

- Hirota Y. A clinical study of left ventricular relaxation. Circulation 1980; 62: 756-763.

- Humphreys LE & Cummins P. Regulatory proteins of the myocardium. Atrial and ventricular tropomyosin and troponin-I in the developing of adult bovine and human heart. J Mol Cell Cardiol 1984; 16: 643-657.

- Jacobus WE, Pores IH, Lucas SK, Weisfeldt ML & Flaherty JT. Intracellular acidosis and contractility in the normal and ischemic heart as examined by ³¹P NMR. J Mol Cell Cardiol 1982; 14: 13-20.

- Jennings RB, Baum JH & Herdson PB. Fine structural changes in myocardial ischemic injury. Arch Pathol 1965; 67: 441-452.

- Jennings RB & Hawkins HK. Ultrastructural Changes of Acute Myocardial Ischemia. En: Degradative Processes in Heart and Skeletal Muscle. K. Wildenthal (ed), 1980; pp 295-346.

- Jennings RB, Murry CE & Reimer KA. Energy metabolism in preconditioned and control myocardium: effect of total ischemia. J Mol Cell Cardiol 1991; 23: 1449-1458.

- Jennings RB & Reimer KA. Factors involved in salvaging ischemic myocardium: Effect of reperfusion of arterial blood. Circulation 1983; 68: 25-36.

- Jennings RB, Reimer KA, Hill ML & Mayer SE. Total ischemia in dog hearts in vitro. 1. Comparison of high energy phosphate production, utilization and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs. severe ischemia in vivo. Circ Res 1981; 49: 892-900.

- Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen C. Myocardial ischemia revisited. The osmolar load, membrane damage, and reperfusion. J Mol Cell Cardiol 1986; 18: 769-780.

- Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen C. Effect of inhibition of the mitochondrial ATPase on net myocardial ATP in total ischemia. J Mol Cell Cardiol 1991; 23: 1383-1395.

- Jennings RB, Schaper J, Hill ML, Steenbergen C & Reimer KA. Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury: Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure. Circ Res 1985; 56: 262-278.

- Jennings RB, Sommers HM, Kaltenbach JP & West JJ. Electrolyte alterations in acute myocardial ischemic injury. Circ Res 1964; 14: 260-269.

- Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA & Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. Arch Pathol 1960; 70: 68-78.

- Kass RS & Tsien RW. Multiple effects of calcium antagonists on plateau current in cardiac Purkinje fibres. J Gen Physiol 1975; 66: 169-192.

- Katz AM. Cardiomyopathy of overload. A major determinant of prognosis in congestive heart failure. N Engl J Med 1990; 322: 100-110.

- Katz AM. Excitation-Contraction Coupling. Calcium Fluxes Across the Sarcoplasmic Reticulum and Mitochondria. En: Physiology of the Heart. A.M. Katz (ed). Raven Press. New York, 1992, pp 243-273.

- Kimura J, Noma A & Irisawa H. Na-Ca exchange current in

mammalian heart cells. *Nature* 1986; 319:596-599.

- Kirby MS, Sagara Y, Gaa S, Inesi G, Lederer WJ & Rogers TB. Thapsigargin inhibits contraction and Ca^{2+} transients in cardiac cells by specific inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump. *J Biol Chem* 1992; 267: 12545-12551.

- Kloner RA, Ellis SG, Lange R & Braunwald E. Studies of experimental coronary artery reperfusion: Effects on infarct size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure and microvascular damage. *Circulation* 1983; 68: 8-15.

- Kloner RA, Ganote CE & Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest* 1974; 54: 1496-1508.

- Kranias EG, Steenaart NAE & Di Salvo J. Purification and characterization of phospholamban phosphatase from cardiac muscle. *J Biol Chem* 1988; 263: 15861-15867.

- Krinsky NI. Membrane antioxidants. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 551: 17-33.

- Kusuoka H, Porterfield JK, Weisman HF, Weisfeldt ML & Marban E. Pathophysiology and pathogenesis of stunned myocardium:

Depressed Ca^{2+} -activation of contraction as a consequence of reperfusion-induced cellular calcium overload in ferret hearts. J Clin Invest 1987; 79: 950-961.

- Lahouratate P, Quinon MJ & Léoty C. Effects of cyclopiazonic acid, an inhibitor of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum, on Ca^{2+} transport, contraction and relaxation in cardiac muscle. Adv Exp Med Biol 1992; 311: 343-346.

- Langer GA. Calcium and the heart: exchange at the tissue, cell, and organelle levels. FASEB J 1992; 6: 893-902.

- Langer GA. Myocardial calcium compartmentation. Trends Cardiovasc Med 1994; 4: 103-109.

- Langer GA & Brady AJ. The effect of temperature upon contraction and ionic exchange in rabbit ventricular myocardium. J Gen Physiol 1968; 52: 682-713.

- Langer GA & Peskoff A. Calcium concentration and movement in the diadic cleft space of the cardiac ventricular cell. Biophys J 1996; 70: 1169-1182.

- Langer GA & Rich TL. Further characterization of the Na-Ca exchange-dependent Ca compartment in rat ventricular cells. Am J

Physiol 1993; 265: C556-C561.

- Langer GA, Rich TL & Orner FB. Ca^{2+} exchange under non-perfusion-limited conditions in rat ventricular cells: identification of subcellular compartments. Am J Physiol 1990; 259: H592-H602.

- Lansman JB, Hess P & Tsien RW. Blockade of current through single calcium channels by Cd^{2+} , Mg^{2+} and Ca^{2+} . J Gen Physiol 1986; 55: 321-347.

- LeBlanc N & Hume TR. Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. Science 1990; 248: 372-376.

- Lederer WJ, Niggli E & Hadley RW. Sodium-calcium exchange in excitable cells; fuzzy space. Science 1990; 248: 283.

- Lee JA & Allen DG. Changes in intracellular free calcium concentration during long exposures to simulated ischemia in isolated mammalian ventricular muscle. Circ Res 1992; 71: 58-69.

- Lee H-C, Mohabir R, Smith N, Franz MR & Clusin WT. Effect of ischemia on Ca-dependent fluorescence transient in rabbit hearts containing indo-1. Circulation 1988; 78: 1947-1059.

- Levitsky D, De la Bastie D, Schwartz K & Lompré AM. Ca^{2+} -

ATPase and function of sarcoplasmic reticulum during cardiac hypertrophy. Am J Physiol 1991; 261: 23-26.

- Lewartowski B, Hansford RG, Langer GA & Lakatta EG. Contraction and sarcoplasmic Ca^{2+} content in single myocytes of guinea pig heart: effect of ryanodine. Am J Physiol 1990; 259: H1222-H1229.

- Lewartowski B, Rózycka M & Janiak R. Effects of thapsigargin in normal and pretreated with ryanodine guinea pig cardiomyocytes. Am J Physiol 1994; 266: H1829-H1839.

- Liu GS, Thornton JD, Van Winkle DM, Stanley WH, Olsson RA & Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A_1 adenosine receptors in rabbit heart. Circulation 1991; 84: 350-356.

- Lompré A-M, Anger M & Levitsky D. Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps in the cardiovascular system: function and gene expression. J Mol Cell Cardiol 1994; 26: 1109-1121.

- Luciani GB, D'Agnolo A, Mazzucco A, Gallucci V & Salviati G. Effects of ischemia on sarcoplasmic reticulum and contractile myofilament activity in human myocardium. Am J Physiol 1993; H1334-H1341.

- Marban E, Kitakaze M, Koretsune Y, Yue DT, Chacko VP & Pike MM. Quantification of $[Ca^{2+}]_i$ in perfused hearts. Critical evaluation of the 5F-BAPTA and nuclear magnetic resonance method as applied to the study of ischemia and reperfusion. Circ Res 1990; 66: 1255-1267.

- Marban E, Koretsune Y, Corretti MC, Chacko VP & Kusuoka H. Calcium and its role in myocardial cell injury during ischemia and reperfusion. Circulation 1989; 80: 17-22.

- Marban E, Koretsune Y & Kusuoka H. Disruption of Intracellular Ca^{2+} Homeostasis in Hearts Reperfused After Prolonged Episodes of Ischemia. Ann N Y Acad Sci 1994; 273: 38-50.

- Matsuda M, Catena TG, Vander Heide RS, Jennings RB & Reimer KA. Cardiac protection by ischemic preconditioning is not mediated by myocardial stunning. Cardiovasc Res 1993; 27: 585-592.

- McCleskey EW, Fox AP, Feldman D & Tsien RW. Different types of Ca channels. J Exp Biol 1986; 124: 191-201.

- Meissner G. Ryanodine activation and inhibition of the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum. J Biol Chem 1986; 261: 6300-6306.

- Meissner G. Ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels and their

regulation by endogenous effectors. *Annu Rev Physiol* 1994; 56: 485-508.

- Meissner G & Henderson JS. Rapid calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles is dependent on Ca^{2+} and is modulated by Mg^{2+} , adenine nucleotide and calmodulin. *J Biol Chem* 1987; 262: 3065-3073.

- Miller CD, Richard JL, Hembrough FB, Osweiler GD & Cox DF. In vitro effects of the cyclopiazonic acid mycotoxin on turkey papillary muscles. *Am J Vet Res* 1990; 51: 836-838.

- Miller TW & Tormey JMcD. Subcellular calcium pools of ischaemic and reperfused myocardium characterised by electron probe. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 85-94.

- Mitchell RD, Simmerman HKB & Jones LR. Ca^{2+} -binding effects on protein conformation and protein interactions of canine cardiac calsequestrin. *J Biol Chem* 1988; 263: 1376-1381.

- Mitra R & Morad M. Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 5340-5344.

- Miura T, Goto M, Urabe K, Enoh A, Shimamoto K & Iimura O. Does myocardial stunning contribute to infarct size limitation by ischemic preconditioning ?. *Circulation* 1991; 84: 2504-2512.

- Mouton R, Huisamen B & Lochner A. Increased myocardial inositol triphosphate levels during alpha-1-adrenergic stimulation and reperfusion of ischemic rat heart. J Mol Cell Cardiol 1991; 23: 841-850.

- Murry CE, Jennings RB & Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 1986; 74: 1124-1136.

- Nakamura M, Takeshita A & Nose Y. Clinical characteristics associated with myocardial infarction, arrhythmias and sudden death in patients with vasospastic angina. Circulation 1987; 75: 1110-1116.

- Naslund U, Haggmark S, Johansson G, Marklund SL & Reiz S. Limitation of myocardial infarct size by superoxide dismutase as an adjunct to reperfusion after different durations of coronary occlusion in the pig. Circ Res 1990; 66: 1294-1301.

- Nayler WG. The role of calcium in the ischemic myocardium. Am J Pathol 1981; 102: 262-270.

- Nayler WG. Calcium and cell death. Eur Heart J 1983; 4 (Suppl. C): 33-41.

- Nohl H, Stolze K, Napetschnig S & Ishikawa T. Is oxidative stress primarily involved in reperfusion injury of the ischemic heart ?. Free

Rad Biol Med 1991; 11: 581-588.

- Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. Nature 1983; 305: 147-158.

- Opie LH. Reperfusion injury and its pharmacologic modification. Circulation 1989; 80: 1049-1062.

- Opie LH & du Toit EF. Postischemic stunning: the two-phase model for the role of calcium as pathogen. J Cardiovasc Pharmacol 1992; 20: S1-S4.

- Otsu K, Willard HF, Khanna VK, Zorzato F, Green NM & MacLennan DH. Molecular cloning of cDNA encoding the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. J Biol Chem 1990; 265: 13472-13483.

- Packer M. Pathophysiology of chronic heart failure. Lancet 1992; 340: 88-92.

- Page E. Quantitative ultrastructural analysis in cardiac membrane physiology. Am J Physiol 1978; 63: C147-C158.

- Pérez MD, Fueyo J & Barrigón S. Negative inotropic effect induced by diethylamiloride (DEA) in rabbit myocardium. J Pharm

Pharmacol 1990; 42: 667-669-

- Pérez G, Marrugot J, Sala J & the REGICOR Study Group. Myocardial infarction in Girona: attack rate, mortality rate and 28-day case fatality in 1988. J Clin Epidemiol 1993; 46: 1173-1179.

- Pérez-Cao A, Gil-Loyzaga P, Merchán-Pérez A & Tamargo J. Effects of oxodipine and nitrendipine on the size of experimental myocardial infarct in the rat. Pharmacol Toxicol 1994; 74: 321-329.

- Pery-Man N, Chemla D, Coirault C, Suard I, Riou B & Lecarpentier Y. A comparison of cyclopiazonic acid and ryanodine effects on cardiac muscle relaxation. Am J Physiol 1993; 265: H1364-H1372.

- Philipson KD, Bersohn MM & Nishimoto AY. Effects of pH on Na^+ - Ca^{2+} exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. Circ Res 1982; 50: 287-293.

- Pollack GH. The cross-bridge theory. Physiol Rev 1983; 63: 1049-1113.

- Poole-Wilson PA, Harding DP, Bourdillon PDV & Tones MA. Calcium out of control. J Mol Cell Cardiol 1984; 16: 175-187.

- Post JA & Langer GA. Sarcolemmal calcium binding sites in

heart: I. Molecular origin in "gas dissected" sarcolemma. J Membr Biol 1992; 129: 49-57.

- Post JA, Langer GA, Op den Kamp JAF & Verkleij AJ. Phospholipid asymmetry in cardiac sarcolemma. Analysis of intact cells and "gas-dissected" membranes. Biochem Biophys Acta 1988; 943: 256-266.

- Rahimtoola SH. The hibernating myocardium. Am Heart J 1989; 117: 211-221.

- Reimer KA & Jennings RB. Myocardial Ischemia, Hypoxia, and Infarction. En : The Heart and Cardiovascular System. Scientific Foundations. H.A. Fozzard, R.B. Jennings, E. Haber, A.M. Katz & H.E. Morgan (eds.). Raven Press. New York, 1986; pp 1133-1202.

- Reimer KA, Vander Heide RS & Jennings RB. Ischemic preconditioning slows ischemic metabolism and limits myocardial infarct size. En: Annals of the New York Academy of Sciences (Vol 273). D.K. Das (ed). New York, 1994, pp 99-115.

- Rich TL, Langer GA & Klassen MG. Two components of coupling calcium in single ventricular cells of rabbits and rats. Am J Physiol 1988; 254: H937-H946.

- Rosenberg RL, Hess P & Tsien RW. Cardiac calcium channels in planar lipid bilayers: L-type channels and calcium-permeable channels open at negative membrane potentials. *J Gen Physiol* 1988; 92: 27-54.

- Rousseau E, Smith JS & Meissner G. Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca^{2+} release channels. *Am J Physiol* 1987; 253: C364-C368.

- Rowe GT, Manson NH, Caplan M & Hess ML. Hydrogen peroxide and hydroxyl radical mediation of activated leukocyte depression of cardiac sarcoplasmic reticulum: Participation of the cyclooxygenase pathway. *Circ Res* 1983; 53: 584-591.

- Sagara Y & Inesi G. Inhibition of the sarcoplasmic Ca^{2+} transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations. *J Biol Chem* 1991; 266: 13503-13506.

- Saito A, Inui M, Radermacher M, Frank J & Fleischer S. Ultrastructure of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 1988; 107: 211-219.

- Salinas P, Pérez MD, Fernández-Sanpablo R, Fernández-Gallardo S, Sánchez-Crespo M & Barrigón S. Lack of platelet-activating factor release on acute myocardial ischemia in the isolated interventricular septum of rabbit heart. *Eur J Pharmacol* 1995; 293: 65-70.

- Sanguinetti MC, Krafte DS & Kass RS. Voltage-dependent modulation of Ca^{2+} channel current in heart cells by Bay K8644. *J Gen Physiol* 1986; 88: 369-392.
- Schomig A. Catecholamines in myocardial ischemia. Systemic and cardiac release. *Circulation* 1990; 80: 13-22.
- Schott RJ, Rohmann S, Braun ER & Schaper W. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res* 1990; 66: 1133-1142.
- Schwalb H, Izhar U, Yaroslavsky E. The effect of aminoacids on the ischemic heart: improvement of oxygenated crystalloid cardioplegic solution by an enriched branched chain aminoacid formulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989; 98: 551-560.
- Seidler NW, Jona I, Vegh M & Martonosi A. Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1989; 264: 17816-17823.
- Sham JSK, Cleeman L & Marad M. Functional coupling of Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 121-125.
- Shigematsu S, Sato T, Abe T, Saikawa T, Sakata T & Arita M.

Pharmacological evidence for the persistent activation of ATP-sensitive K^+ channels in early phase of reperfusion and its protective role against myocardial stunning. *Circulation* 1995; 92: 2266-2275.

- Shine KI, Douglas AM & Ricchiuti N. Ischemia in isolated interventricular septa: mechanical events. *Am J Physiol* 1976; 231: 1225-1232.

- Siegmund B, Schlüter K-D & Piper HM. Calcium and the oxygen paradox. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 1778-1783.

- Steenbergen C, Murphy E, Levy L & London RE. Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circ Res* 1987; 60: 700-707.

- Steenbergen C, Murphy E, Watts A & London RE. Correlation between cytosolic free $[Ca^{2+}]_i$ contracture, ATP and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ Res* 1990; 66: 135-146.

- Steenbergen C, Perlman ME, London RE & Murphy E. Mechanism of preconditioning: ionic alterations. *Circ Res* 1993; 72: 112-125.

- Tada M, Yamamoto T & Tonomura Y. Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum. *Physiol Rev* 1978; 58:

1-79.

- Taegtmeyer H, Roberts AFC & Raine AEG. Energy metabolism in reperfused heart muscle: Metabolic correlates to return of function. J Am Coll Cardiol 1985; 6: 864-870.

- Takahashi S, Kato Y, Adachi M, Agata N, Tanaka H & Shigenobu K. Effects of cyclopiazonic acid on rat myocardium: Inhibition of calcium uptake into sarcoplasmic reticulum. J Pharm Exp Ther 1995; 272: 1095-1100.

- Tanaka H & Shigenobu K. Effect of ryanodine on neonatal and adult rat heart: Developmental increase in sarcoplasmic reticulum function. J Mol Cell Cardiol 1989; 21: 1305-1313.

- Thom TJ. International mortality from heart disease: rates and trends. Int J Epidemiol 1989; 18: S20-S28.

- Thornton JD & Downey JM. G_i proteins are involved in preconditioning's protective effect. Circulation 1991; 84: II-192 (abstract).

- Thornton JD, Striplin S, Liu GS, Swafford A, Stanley WH, Van Winkle DM & Downey JM. Inhibition of protein synthesis does not block myocardial protection afforded by preconditioning. Am J Physiol 1990;

259: H1822-H1825.

- Uyama Y, Imaizumi Y & Watanabe M. Effects of cyclopiazonic acid, a novel Ca^{2+} -ATPase inhibitor, on contractile responses in skinned ileal smooth muscle. Br J Pharmacol 1992; 106: 208-214.

- Van der Vusse GJ, Roemen THM & Reneman RS. The content of non-esterified fatty acids in rat myocardial tissue. A comparison between the Dole and Folch extraction procedures. J Mol Cell Cardiol 1985; 17: 527-531.

- Vandeplasseche G & Borgers M. Ultrastructure and Ca^{2+} reallocation during ischemia, the Ca^{2+} paradox and metabolic acidosis. Cell Biol Int Rep 1990; 14: 317-334.

- Vogel WM, Apstein CS, Briggs LL, Gaasch WH & Ahn J. Acute alterations in left ventricular diastolic chamber stiffness. Role of the "erectile" effect of coronary arterial pressure and flow in normal and damaged hearts. Circ Res 1982; 51: 465-476.

- Vyska K, Machulla HJ, Stremmel W, Fassbender D, Knapp WH, Notohamiprodjo G, Gleichmann U, Meyer H, Knust EJ & Korfer R. Regional myocardial free fatty acid extraction in normal and ischemic myocardium. Circulation 1988; 78: 1218-1233.

Efectos antiisquémicos del bloqueante de
la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico, Acido etidopirazinico, sobre la isquemia
experimental del corazón de conejo MARTIN DEL

ARELLANO CALZADILLA

DEBIDO A LA FALTA DE APTIDUD PARA LA CATEDRA DE QUIMICA

16 de Diciembre de 1996

El Vocal

El Vocal

El Vocal

Honorario